



Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle thiorédoxine plastidiale (TRX z) chez *Arabidopsis Thaliana*

Anne-Sophie Bohrer

► To cite this version:

Anne-Sophie Bohrer. Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle thiorédoxine plastidiale (TRX z) chez *Arabidopsis Thaliana*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112397 . tel-01164958

HAL Id: tel-01164958

<https://theses.hal.science/tel-01164958>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VÉGÉTAL

Thèse

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

Anne-Sophie BOHRER

Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle thiorédoxine plastidiale (TRX z) d'*Arabidopsis thaliana*

Soutenance prévue le 20 décembre 2012, devant le jury d'examen :

Pr. Graham NOCTOR, IBP, Université Paris-Sud
Dr. Corinne CASSIER-CHAUVAT, CEA Saclay
Dr. Pascal REY, CEA Cadarache
Dr. Anja KRIEGER-LISZKAY, CEA Saclay
Dr. Hélène VANACKER, IBP, Université Paris-Sud

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont acceptés d'évaluer mon travail.

Voici le moment qu'un étudiant en thèse attend pendant 3 ans : la fin de la rédaction ! Et le meilleur moment, pour moi, de me rappeler comment j'en suis arrivée là... Pour moi, la biologie végétale n'est pas une vocation, mais les bonnes rencontres et les bons conseils, aux bons moments, m'ont menée jusqu'ici.

Je remercie tout d'abord François Bouteau et Jean-Pierre Rona, chez qui j'ai eu l'occasion et la chance de faire mon tout premier stage en laboratoire. Même si l'électrophysiologie n'est finalement pas ce vers quoi je me suis orientée, ce stage a été pour moi le début d'une belle expérience et de ma carrière scientifique (je ne me suis pas lassée de compter et de mesurer l'ouverture de stomates pendant 3 mois, ça veut certainement dire quelque chose !). C'est aussi pour cette raison que je tiens à remercier Patrice Meimoun, qui m'a encadrée durant mon stage de Master 1, au cours duquel il m'a appris à peler les feuilles d'Arabido ... mais pas que ! C'est à la fin de ce stage que j'ai su que je voulais faire de la recherche. C'est un deuxième « merci » que je lui envoie car c'est également grâce à lui que j'ai pu intégrer l'IBP en 2009, pour y réaliser mon stage de Master 2 dans l'équipe AKIN, la seule et l'unique, et commencer mon parcours de petit scientifique... Je tiens donc à remercier tout particulièrement Martine, Pierre, Jean et Françoise, qui m'ont initiée aux joies de la biochimie.

Je remercie Hélène, grâce à qui j'ai pu continuer en thèse. Même si tout ne s'est pas déroulé comme prévu, on fait une super équipe !!! Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité de défendre ton projet. Et je dois te dire que je suis ravie d'être ta première doctorante ! J'espère juste que tu n'as pas pris peur et que d'autres suivront !!! Même si tout n'a pas été facile au cours de ces trois ans, on l'a eu cette protéine, et en plus, on commence même à entrevoir ce qu'elle pourrait faire !!!! Pfiou, ce n'était pas gagné ! Mais quand on a une chef qui y croit comme toi, ça donne forcément quelque chose de bien.

Merci bien sur à Emmanuelle et Myroslawa : merci à vous deux pour votre aide. Merci Emma de m'avoir consacré tant de temps et d'avoir été si souvent disponible et merci Myros pour tes conseils avisés et précieux et merci d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit. Merci à vous trois pour vos encouragements et votre soutien, surtout lorsque j'étais bloquée la tête dans l'armoire froide à attendre désespérément que cette fameuse TRX z se purifie !

Je remercie évidemment Gilles, mon Jason depuis presque deux ans, avec qui partager le labo et le bureau a été très agréable ! Merci pour tes beaux origamis, tes bons gâteaux, ta bonne humeur et ton aide précieuse à la paillasse ! A mon départ, je te confie la garde de l'armoire métallique, prends en soin !

Merci également à Guillaume pour ses conseils et ses grandes discussions sur... tout ! Merci également à ceux avec qui je n'ai partagé que de brefs moments : Stéphane, Mariette, Xing Huang et Florence. Merci également aux stagiaires qui ont régulièrement envahi le labo durant ces trois ans et qui ont apporté de la très bonne humeur : Roxon, Séverine, Louis, Antoine, Sarah, Elven et Marjorie.

Je remercie tout particulièrement Paulette Decottignies, sans qui il n'y aurait pas eu de TRX z non étiquetée ni de cibles de la TRX z... j'espère que l'on continuera à travailler ensemble dans les prochains mois afin de faire « parler » cette TRX !

Merci pour ton temps et ton expertise et merci à toi, ainsi qu'à Pierre, de m'avoir accueillie pour ces quelques semaines dans vos locaux ; merci à Raouda et Violaine pour leur aide précieuse.

Je remercie également Florence Vignols et Christophe Brugidou de m'avoir accueillie dans le sud, où il faut beau même en février, dans leur laboratoire, à l'IRD de Montpellier. Merci pour ta patience Florence et merci de m'avoir appris comment bichonner ces levures ! Je remercie également Séverine, Martine, Erika la belle catalane, FX, Vianney, William de Narbonne, Fernando Gaga, Céline et tous les autres, grâce auxquels j'ai passé 3 mois très agréables mais qui m'ont malheureusement fait comprendre que, pour avoir du beau temps, il faut être dans le sud ! Merci à Hanka, Alain et Lila de m'avoir accueillie dans leur famille pendant ces trois mois, j'ai passé un séjour d'autant plus agréable grâce à vous. Je remercie également le GDR « TRX et GRX », et tout particulièrement Jean-Philippe Reichheld, sans qui ce séjour scientifique n'aurait pu se faire.

Je remercie le comité scientifique de la Société Française de Photosynthèse d'avoir récompensé mon travail en m'accordant une bourse.

Merci à Catherine Bergougnieux, Quentin et Sophie B pour leur aide sur certaines manips et leurs conseils. Merci Sophaïe pour ta bonne humeur et ton rire communicatifs et d'être toujours aux petits soins pour nous.

Merci également à Jean-Paul, Eric, Gilles Santé et Sophie Massot pour leur aide au quotidien. Jean-Paul, Eric, merci pour le temps que vous nous consacrez : par contre, Eric, laisse le « h » de Nathalie tranquille et Jean-Paul, si je trouve un ballon à gonfler d'hélium, je descends te voir !

Merci à Sylvie, Véronique et Meeriam qui sont présentes pour nous au quotidien, et merci à Chantal d'avoir géré d'une main de maître le planning des topos du jeudi !

Je tiens également à remercier mes collègues d'enseignement, et tout particulièrement Céline et Marie D : merci de m'avoir transmis votre savoir et votre passion, et merci pour vos conseils et votre soutien.

Je remercie bien sûr tous ceux avec qui j'ai, tout compte fait, partagé presque 80% de mon temps depuis 3 ans : Laure ; Linda, qui a toujours le sourire (et contagieux en plus !) et qui est bien souvent présente dans les moments difficiles ; Jean-CIAAAude et ses chocobons ; Caroline, merci pour tes belles photos ; Pierre ; Thomas ; Nicolas, le potoman aux jambes ridiculement petites ; les collègues de Doc' en Herbe ; Nathalie, pour ces petites discussions qui réconfortent bien souvent, qui redonnent du baume au cœur ou qui font juste rire ! Merci à Michel de prendre soin de nous et de veiller sur nous et à Maryelle pour tes petits mots gentils qui font toujours plaisir.

Merci à Gwen, qui a amené du soleil ici à l'IBP avec son accent chantant ! Une rencontre marquante pour moi et de très bons moments passés grâce à toi.

Petite section spéciale tout de même pour Manon et Erwan : merci d'avoir accepté d'être mes acolytes des topos, merci pour votre bonne humeur, vos conseils et tout le reste (et il y en a eu des choses !). Manon, j'espère que tu ne m'en veux pas de ne toujours pas comprendre ce que sont les banques BAC gridées et non gridées... de toute façon j'adore les haricots, alors ça compense. Je suis heureuse de vous connaître et d'avoir pu partager tant de choses avec vous. Merci aussi à Peter et à toutes les coccinelles du monde, sans qui la vie ne serait vraiment pas la même !

Parce qu'il n'y a pas que le labo dans la vie (ah bon ?), je dis merci à tous ceux qui me soutiennent, même s'ils ne comprennent pas tout à fait ce que je fais : Flo, Jacko, Sam, Karine, Fred, Aurélie, Fabrice, le Steph et toute la team ! Un message tout particulier pour Stéphanie et Martin, scientifiques dans l'âme : merci pour vos encouragements et votre présence, très importante, motivante et réconfortante pour moi ces derniers mois.

Je remercie surtout ma famille, qui a su me guider, m'épauler, me soutenir et me supporter, depuis bien plus longtemps que 3 ans, certes. Merci à mes parents de croire en moi aussi fort. Merci à ma sister sister d'être là, de plus en plus, et à Sébastien pour les tours de salsa coche le matin : ça réveille et ça met de bonne humeur ! Merci également à Sophia pour son aide, ses conseils et sa présence au cours de ces derniers mois.

Enfin, je remercie Anthony qui m'a accompagnée, épaulée, soutenue, rassurée et motivée quand j'en avais besoin. Merci d'avoir été présent et patient, surtout dans cette période finale qui peut parfois mettre les nerfs à rude épreuve. Merci de me faire croire en toi qui crois en moi.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Origine et fonctions des thiorédoxines	2
A. Découverte des thiorédoxines	2
B. Identification du mécanisme catalytique des thiorédoxines	3
II. Les thiorédoxines chez les plantes supérieures	4
A. Découverte des thiorédoxines chez les végétaux	4
B. Une multiplicité de thiorédoxines révélée lors de la révolution génomique	5
1) Les thiorédoxines hétérotrophes	6
2) Les thiorédoxines plastidiales	8
3) Les « thiorédoxin-like »	10
III. Les systèmes de réduction connus des thiorédoxines	11
A. Le système NADPH-thiorédoxine réductase (NTR)	11
B. Le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR)	11
C. Le système de réduction GSH/GRX	12
IV. Cibles des thiorédoxines	12
A. Recherche de cibles des thiorédoxines	13
1) Méthode du « réductome »	13
2) Colonne d'affinité monocystéinique	14
3) Colonne d'interactions électrostatiques	15
4) Méthode de protéomique redox (ICAT)	15
5) Criblage double hybride chez la levure	16
B. Spécificité et redondance fonctionnelle des thiorédoxines plastidiales	17
V. Objectifs de la thèse	19
MATÉRIELS & MÉTHODES	21
I. Matériels	21
A. Matériel procaryotique	21
B. Matériel végétal	23
II. Méthodes	25
A. Clonage, production et purification de TRX z non étiquetée	25
B. Clonage, production et purification de TRX étiquetée (<i>Strep</i> -tag)	32

C.	Production et purification des protéines recombinantes NTRC et MSRB2, étiquetées polyHis	34
D.	Techniques générales pour l'analyse des protéines	35
1)	Dosages des protéines	35
2)	Électrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE)	36
3)	Coloration des protéines au bleu de Coomassie	37
4)	Transfert des protéines sur membrane	37
5)	Western blot	37
E.	Tests <i>in vitro</i> de l'activité oxydoréductase de la TRX z	38
1)	Test de réduction de l'insuline (test turbidimétrique)	38
2)	Test d'activation de la MDH à NADP	38
3)	Test d'activité de la G6PDH	39
4)	Test d'activation de la 2-Cys PRX	40
F.	Recherche du système de réduction de la TRX z	40
1)	Mise en évidence de la réduction de la TRX z par traitement chimique et marquage radioactif des groupements thiols	40
2)	Test de réduction de la TRX z par la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR)	41
3)	Test de réduction de la TRX z par les NADPH-thiorédoxine réductases cytosolique et plastidiale (NTRA et NTRC)	43
4)	Test de réduction de la TRX z par le système GSH/GRX	44
5)	Test de réduction de la TRX z par les autres thiorédoxines plastidiales	44
G.	Recherche de cibles de la TRX z	44
1)	Recherche de cibles de la TRX z par colonne d'affinité (approche <i>in vitro</i>)	45
2)	Criblage double hybride en système levure (approche <i>in vivo</i>)	47
H.	Étude fonctionnelle de la TRX z	51
1)	Analyse de l'expression de la TRX z et des autres thiorédoxines plastidiales dans différentes conditions de lumière	51
2)	Étude du rôle de la TRX z dans la réponse immune innée (approche par génétique inverse)	53
3)	Obtention de lignées TRX z-GFP	55

RÉSULTATS **56**

I.	Analyses préliminaires de la TRX z	56
II.	Clonage, production et purification de la TRX z recombinante non étiquetée	59
A.	Purification de la TRX z recombinante avec le protocole classique	59
B.	Optimisation du protocole de production et purification de la TRX z recombinante	62

1)	Production de la TRX z, thermostabilité et fractionnement au sulfate d'ammonium	62
2)	Test d'activation de la MDH à NADP	63
3)	Purification de la TRX z par chromatographie d'exclusion	63
4)	Purification de la TRX z par chromatographie sur colonnes échangeuses d'anions	65
III.	Étude de l'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z étiquetée selon son état redox	69
A.	Obtention de la TRX z recombinante étiquetée	69
B.	Test de réduction chimique de la TRX z	70
C.	Étude de l'état d'oxydoréduction de la TRX z	71
D.	Étude de la dimérisation de la TRX z en système levure <i>in vivo</i>	72
IV.	Capacité d'oxydoréductase et recherche du système de réduction de la TRX z	74
A.	Recherche du système de réduction de la TRX z : données publiées	74
B.	Données complémentaires non publiées	91
1)	Test de réduction de la TRX z par la NTRC	91
2)	Test d'activation et d'inhibition de la G6PDH par la TRX z	91
3)	Test de réduction de l'insuline par la TRX z	92
V.	Recherche de cibles spécifiques de la TRX z	95
A.	Recherche de cibles de la TRX z par approche <i>in vitro</i>	95
B.	Recherche de cibles de la TRX z par approche <i>in vivo</i>	104
1)	Cibles identifiées en utilisant la TRX z sauvage non mutée comme appât (appât TRX z – WT)	104
2)	Cibles identifiées en utilisant la TRX z mutée sur le deuxième résidu cystéine du site actif comme appât (appât TRX z – C109S)	106
C.	Analyse des résultats de recherche de cibles putatives de la TRX z	111
VI.	Caractérisation fonctionnelle de la TRX z	112
A.	Analyse de l'expression de la TRX z parmi les autres thiorédoxines plastidiales	112
1)	Expression des thiorédoxines plastidiales dans les différents organes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
2)	Analyse de l'expression des thiorédoxines plastidiales en fonction des conditions d'éclairement	113
3)	Analyse de l'expression des thiorédoxines plastidiales au cours du cycle circadien	115
B.	Rôle de la TRX z dans la réponse immune innée (approche par génétique inverse)	117
1)	Génotypage des mutants d'insertion <i>trx z</i>	117
2)	Étude du rôle de la TRX z au cours de la réponse immune innée	119

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	124
BIBLIOGRAPHIE	136
ANNEXES – FICHES TECHNIQUES	150
ANNEXES – COLLOQUES ET CONGRÈS	159

Abréviations

A

A	Absorbances
ACCase	Acétyl-CoA Carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATP	Adénosine tri-phosphate

B

BCA	Acide bicinchoninique
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Sérum albumine bovine

D

DEAE	Diéthyl aminoéthyl
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DNase	Acide désoxyribonucléase
dNTP	Désoxynucléosides triphosphate
DO	Densité optique
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-Nitrobenzoate)
DTTox	trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane
DTT _{red}	Dithiothréitol

E

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique

F

FAD	Flavine adénine nucléotide
FBPase	Fructose-1,6-biphosphatase
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine-NADP réductase
FTR	Ferrédoxin-thiorédoxine réductase
FST	Séquences flanquantes d'ADN-T

G

G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPX	Glutathion peroxydase
GRX	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit

GSSG

Glutathion oxydé

H

HR	Réponse hypersensible
----	-----------------------

I

IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
------	-------------------------------------

L

LB	Luria Bertani
----	---------------

M

MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry
MAPK	Mitogen Activated Phospho Kinase
MDH	Malate déshydrogénase
MES	Acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonic
MSR	Methionine sulfoxide réductase

N

NADP	Nicotianamide adenine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH	Nicotianamide adenine dinucléotide phosphate réduit
NTR	NADPH-thiorédoxine réductase

O

OAA	Oxaloacétate
-----	--------------

P

p/v	poids/volume
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Phényl methyl sulfonyl fluorure
PRK	Phosphoribulokinase
PRX	Peroxyrédoxine
P.S.I.	Pound per square inch
PSI	Photosystème I
PTI	PAMP-Triggered Immunity (Réponse immune innée)
PVDF	Polyvinylidène fluoride

PVP Polyvinylpyrrolidone

R

RNase Ribonucléase
RNR Ribonucléotide réductase
RT Reverse transcription
ROS Espèces réactives de l'oxygène
RuBisCO Ribulose- 1, 5-biphosphatase
carboxylase/oxygénase

S

SBPase Sédoheptulose-1,7-biphosphatase
SDS Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE SDS – polyacrylamide gel
electrophoresis

T

TAE Tris-acétate EDTA
Taq Thermus aquaticus
TCA Acide trichloroacétique
TE Tris EDTA
TEMED N,N,N',N'-tétraméthyl ethylene
diamine
Tris Tris (hydroxyméthyl)
aminométhane
TRX Thiorédoxine

U

U.R Unité relative
UV Ultraviolet

V

v/v volume/volume

Introduction

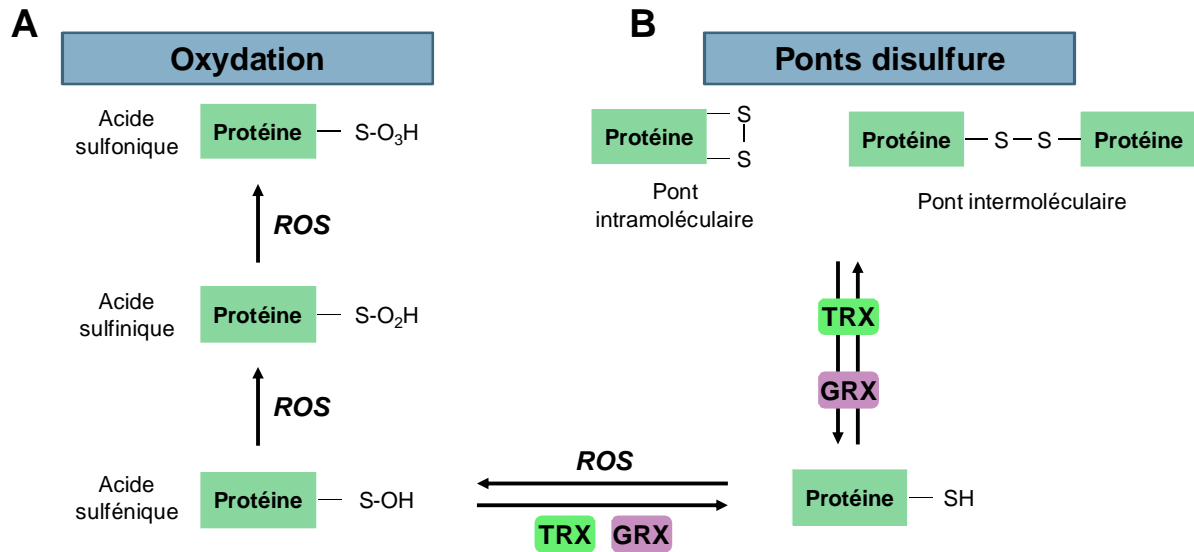


Figure 1 : Différents états d'oxydation des résidus cystéine.

Les résidus cystéine des protéines peuvent être oxydés réversiblement par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en acide sulfénique et en acide sulfinique. Cependant, l'oxydation en acide sulfonique est irréversible (A). Par ailleurs, la réduction des résidus cystéine peut être catalysée par les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX). Celles-ci sont également impliquées dans la formation réversible de ponts disulfure intra-moléculaire ou inter-moléculaire impliquant deux résidus cystéine (B).

Tous les organismes vivants sont continuellement soumis à diverses contraintes environnementales auxquelles ils doivent s'adapter (qualité et quantité de la lumière, température, attaque pathogène, quantité de nutriments,...). Afin de répondre à ces signaux extérieurs, au niveau cellulaire, de nombreuses cascades de signalisation se déclenchent et doivent se mettre en place très rapidement. La rapidité de réponse est souvent dépendante de modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, les cascades de phosphorylation sont particulièrement étudiées et connues.

Cependant, un point commun entre toutes ces contraintes environnementales en vie aérobie est la production de dérivés d'oxygène appelés espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS).

Ces oxydants, qui peuvent être molécules signal ou phytotoxiques selon leur concentration, vont modifier l'état d'oxydation de certaines protéines. Les cystéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation. En effet, les groupements thiols des résidus cystéine présentent plusieurs états croissants d'oxydation allant de l'état sulfénique (SOH) à l'état sulfinique (SO₂H) jusqu'à l'état sulfonique (SO₃H) irréversible (Figure 1 A).

L'oxydation des résidus cystéine des protéines peut également engendrer la formation réversible de ponts disulfure intra ou inter-moléculaires (Figure 1 B). La régulation de l'état d'oxydoréduction de ces résidus cystéine est principalement contrôlée par une famille de protéines appelées « rédoxines » qui regroupe les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX). Ces acteurs sont impliqués dans les mécanismes de signalisation redox qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie redox cellulaire, permettant ainsi aux organismes de s'adapter de façon optimale aux contraintes environnementales.

I. Origine et fonctions des thiorédoxines

A. Découverte des thiorédoxines

La première thiorédoxine a été isolée chez la bactérie *Escherichia coli* et identifiée comme donneur d'électrons. Plus particulièrement, cette protéine de faible masse moléculaire (12 kDa) permet le transfert de pouvoir réducteur à la ribonucléotide réductase (RNR), l'enzyme impliquée dans la réduction des NTP en dNTP (Laurent et al., 1964), substrat nécessaire à la synthèse de l'ADN. Du fait de la présence, dans sa séquence, d'un unique pont disulfure indispensable à son activité d'oxydoréductase, cette protéine a été nommée thiorédoxine (Laurent et al., 1964).

Il a été montré par ailleurs que la réduction du pont disulfure de cette thiorédoxine est catalysée, spécifiquement, par une enzyme à domaine FAD qui utilise le NADPH pour fonctionner. Cette enzyme a ainsi été appelée « NADPH-thioredoxin reductase » (NTR) (Moore et al., 1964).

Ensuite, l'idée d'une fonction plus générale du système thiorédoxine a émergé grâce au développement de tests utilisant l'insuline comme substrat (et donc indépendant de la RNR, Holmgren, 1979) sur des préparations pures de thiorédoxine et de NTR de mammifères isolées (Engström et al., 1974). Parallèlement à cela, la thiorédoxine d'*E. coli* a été identifiée comme sous-unité de l'ADN polymérase T7, s'avérant essentielle à la réplication de l'ADN du phage T7 (Mark and Richardson, 1976).

La viabilité du mutant *trx* d'*E. coli* pour la thiorédoxine a permis par la suite d'identifier la glutarédoxine (GRX) comme donneur d'électrons alternatif à la thiorédoxine, étant capable de réduire également la RNR, mais utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons (Holmgren, 1976). Même si les séquences des glutarédoxines ne montrent que peu d'homologie avec celles des thiorédoxines, ces deux types de réductases de ponts disulfures présentent un repliement similaire et sont donc considérées comme des homologues structuraux, et regroupées dans la super-famille des rédoxines. La spécificité et les caractéristiques des glutarédoxines ne seront pas discutées ici (voir pour revue Fernandes and Holmgren, 2004; Meyer et al., 2012).

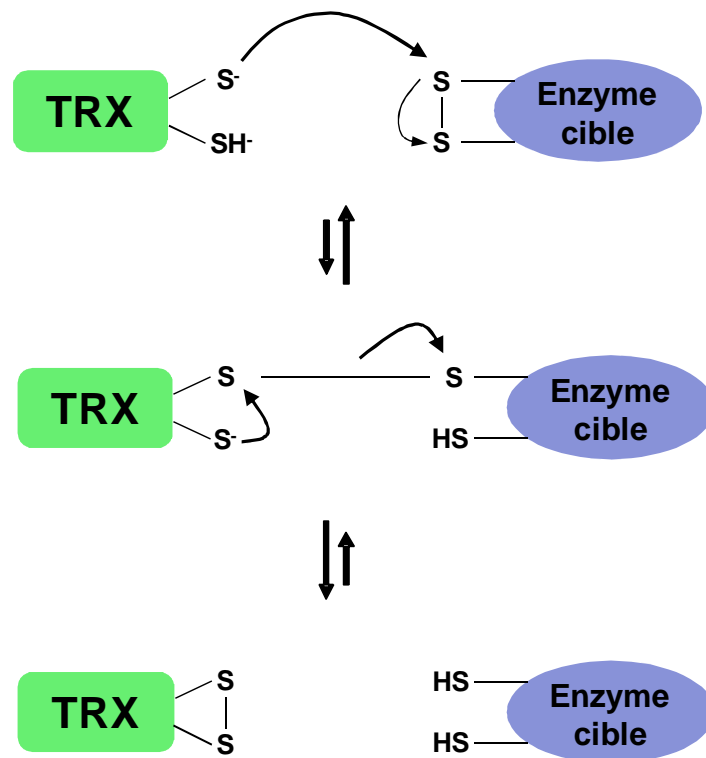


Figure 2 : Mécanisme catalytique des thiorédoxines lors de la réduction du pont disulfure d'une enzyme cible.

Le premier résidu cystéine de la thiorédoxine réduite est responsable de l'attaque nucléophile du pont disulfure de l'enzyme cible. Un pont disulfure mixte transitoire se forme ainsi entre la thiorédoxine et sa cible. Par la suite, le deuxième résidu cystéine de la thiorédoxine attaque ce pont disulfure mixte. La thiorédoxine se trouve alors à l'état oxydé tandis que l'enzyme cible est à l'état réduit.

Des études ultérieures sur la thiorédoxine d'*E. coli* ont révélé que cette protéine est également impliquée dans :

- l'assimilation du sulfate en tant que donneur d'hydrogène pour la 3'-phosphate-5'-phosphosulfate réductase ou PAPS réductase (Tsang and Schiff, 1976; Tsang, 1981) dont l'activité est indispensable à la synthèse d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) ;
- la défense contre le stress oxydant en tant que donneur d'électrons à la méthionine sulfoxyde réductase (MSR ; Ejiri et al., 1979) et aux peroxyrédoxines (PRX).

Des études génétiques sur les mutants *trx⁻ grx⁻* d'*E. coli* ont permis d'identifier plus tard une deuxième thiorédoxine (Miranda-Vizuete et al., 1997).

Les thiorédoxines sont des protéines ubiquistes, le nombre d'isoformes identifiées étant variable selon l'organisme considéré. Par exemple, trois thiorédoxines ont été identifiées chez la levure et seulement deux chez les mammifères.

B. Identification du mécanisme catalytique des thiorédoxines

Holmgren identifie très tôt le site actif de la thiorédoxine d'*E. coli* (Cys-Gly-Pro-Cys), les deux résidus cystéine étant impliqués dans la formation de pont disulfure (Holmgren, 1968). La séquence complète d'acides aminés de cette thiorédoxine fut identifiée plus tardivement (Holmgren et al., 1975). La séquence WCGPC, conservée au sein de tous les organismes, est maintenant devenue la signature des thiorédoxines.

Par l'intermédiaire de ces deux résidus cystéine hautement réactifs, les thiorédoxines ont la capacité de réduire les ponts disulfure de leurs protéines cibles (Figure 2). Le premier résidu cystéine du site actif, la cystéine catalytique, est responsable de l'attaque nucléophile du pont disulfure de la protéine cible. Il en résulte la formation d'un pont mixte intermoléculaire transitoire entre la thiorédoxine et la protéine cible. Par la suite, le deuxième résidu cystéine du site actif attaque ce pont mixte. La protéine cible se trouve alors réduite et la thiorédoxine est oxydée (Holmgren, 1995).

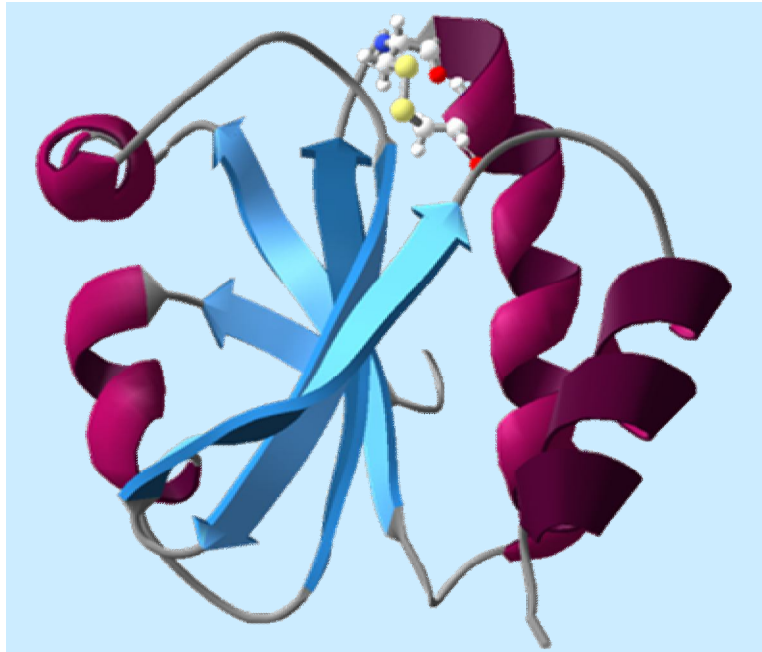


Figure 3 : Structure tridimensionnelle typique des thiorédoxines.

Représentation en rubans d'une structure tridimensionnelle d'une thiorédoxine. La protéine présente le « thioredoxin fold », caractérisé par la succession des éléments secondaires β , α , β , α , β , β , α . Le squelette carboné et les deux résidus cystéine du site actif sont représentés.

En plus de leur signature caractéristique, la structure des thiorédoxines est également très conservée. Celle-ci a été déterminée pour la TRX d'*E. coli* en premier (Holmgren et al., 1975) et consiste en quatre hélices α qui entourent une structure formée de cinq feuillets β , constituant un repliement caractéristique appelé « thioredoxin fold » (Figure 3).

II. Les thiorédoxines chez les plantes supérieures

A. Découverte des thiorédoxines chez les végétaux

Chez les végétaux, les thiorédoxines ont été initialement identifiées lors de travaux portant sur la régulation d'enzymes du cycle de Calvin-Benson à la lumière. Différentes études ont ainsi mis en évidence que certaines enzymes du cycle de Calvin sont activées à la lumière, parmi lesquelles la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Wolosiuk and Buchanan, 1978a), la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) (Buchanan et al., 1967), la séduheptulose-1,7-biphosphatase (SBPase) (Schürmann and Buchanan, 1975) et la phosphoribulokinase (PRK) (Wolosiuk and Buchanan, 1978b). Une autre enzyme, qui n'intervient pas dans le cycle de Calvin-Benson, est également activée à la lumière : il s'agit de la malate déshydrogénase à NADP (MDH à NADP) (Wolosiuk et al., 1977), enzyme impliquée dans la fixation et le transfert du CO_2 . La régulation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) par la lumière fut également démontrée (Scheibe and Anderson, 1981). Cette enzyme catalyse la première étape du cycle oxydatif des pentoses phosphates et est impliquée dans le catabolisme des sucres. A la lumière, la G6PDH est ainsi inactivée.

Il a par ailleurs été montré qu'en présence de DCMU (3(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée), un inhibiteur qui bloque le transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B dans le photosystème II, l'activation des enzymes à la lumière est bloquée. Par ailleurs, l'utilisation de dithiothréitol (DTT_{red}), un réducteur chimique fort, permettait de mimer l'activation de ces enzymes à la lumière. Ceci laissait supposer que l'activation à la lumière de ces enzymes pouvait être liée à leur réduction et qu'un composé protéique, réduit à la lumière lors du transfert d'électrons au sein de la chaîne photosynthétique, était nécessaire à leur activation.

L'étude de l'activation à la lumière de la FBPase suggérait l'implication de la ferrédoxine (Fd) dans ce processus (Buchanan et al., 1967). Cependant, il a été montré que la ferrédoxine n'interagissait pas directement avec la FBPase et que l'activation de l'enzyme nécessitait la présence d'un autre facteur protéique (Buchanan et al., 1971). Lors de la purification de ce facteur, deux composés ont alors été identifiés : ARP_a et ARP_b (Assimilation Regulatory Protein) (Schürmann et al., 1976). Il s'est alors avéré que le facteur ARP_b pouvait être substitué par la TRX d'*E. coli* lors de l'activation de la FBPase en présence de DTT (Buchanan and Wolosiuk, 1976), indiquant ainsi que l'ARP_b correspondait à une thiorédoxine chloroplastique et l'ARP_a à une nouvelle enzyme alors nommée ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) (Wolosiuk and Buchanan, 1977). Le système ferrédoxine/thiorédoxine (Fd/FTR/TRX) était alors identifié chez les végétaux.

Les premières thiorédoxines végétales ont été identifiées dans des feuilles d'épinard (Jacquot et al., 1978; Wolosiuk et al., 1979) : il s'agit des TRX chloroplastiques m et f, nommées d'après leur spécificité de régulation de la MDH à NADP et de la FBPase respectivement. La purification de la FTR (Droux et al., 1987a) a finalement permis de reconstituer le système *in vitro* et de démontrer la suite de réactions permettant la régulation de l'activité de ces enzymes chloroplastiques à la lumière (Droux et al., 1987b). Chez les plantes, les thiorédoxines sont donc d'abord identifiées comme des régulateurs de la photosynthèse, une fonction très différente de celle des thiorédoxines identifiées dans la bactérie *E. coli*.

Par ailleurs, lors de l'identification des TRX m et f, l'existence d'une troisième isoforme cytosolique, appelée TRX c, a été démontrée. La TRX c a été par la suite renommée TRX h pour « hétérotrophe » (Johnson et al., 1987).

B. Une multiplicité de thiorédoxines révélée lors de la révolution génomique

L'essor de la génomique et le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* ont révélé que les thiorédoxines m, f et h identifiées initialement sont codées par une famille multi-génique. De nombreuses nouvelles isoformes de thiorédoxines ont ainsi pu être identifiées

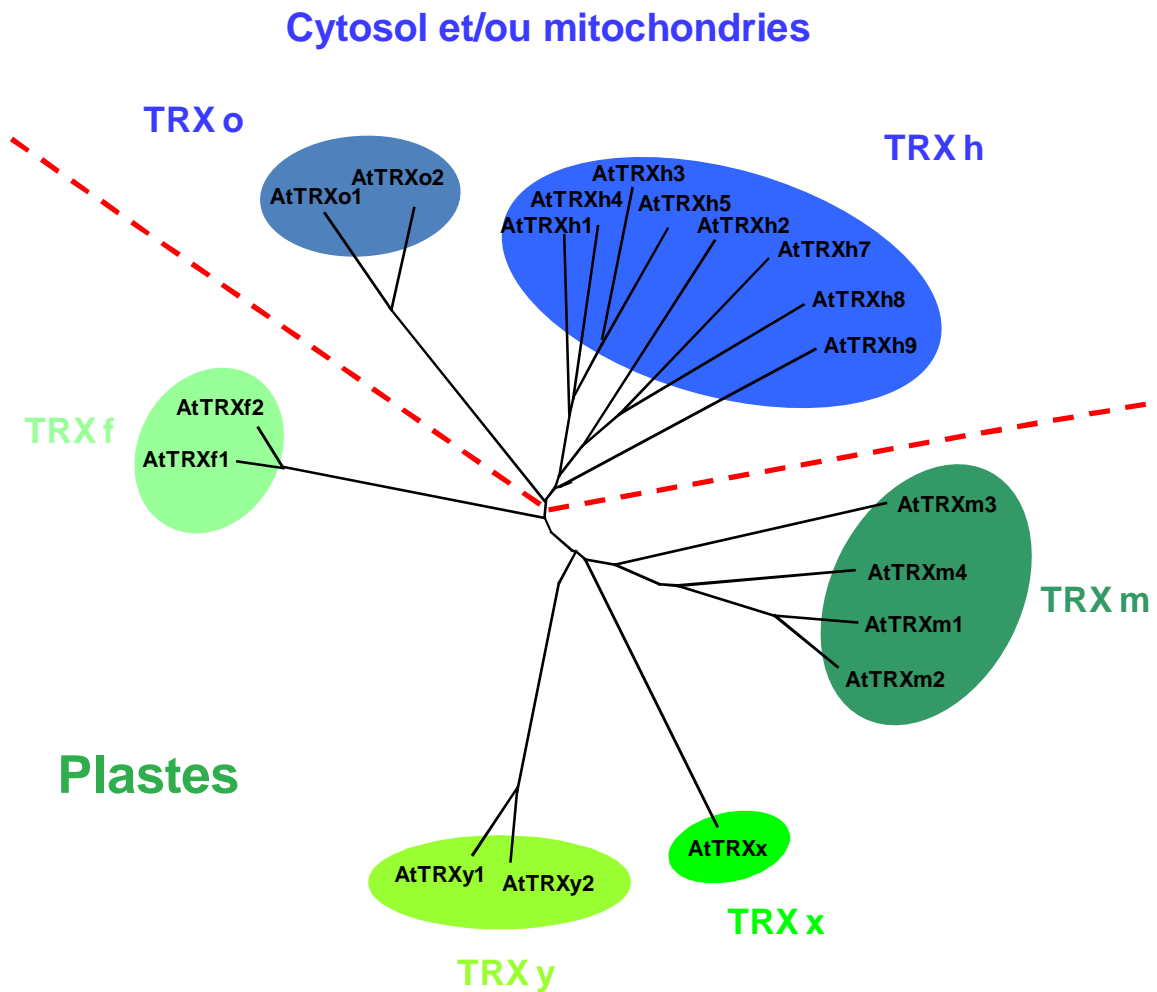


Figure 4 : Arbre phylogénétique des thiorédoxines canoniques chez *Arabidopsis thaliana* en 2009.

Chez *Arabidopsis*, les thiorédoxines canoniques sont classées en trois groupes, sur la base de leur homologie de séquence et du positionnement des introns au sein de leur structure génique. Les TRX de type h définissent ainsi de type cytosolique tandis que les TRX de type o définissent le groupe des thiorédoxines mitochondriales. Au sein des plastides, quatre types de thiorédoxines sont identifiés : les types m (m1 à m4), f (f1 et f2) x, avec un unique représentant, et y (y1 et y2).

chez les végétaux (Mestres-Ortega and Meyer, 1999). Le nombre de thiorédoxines dites canoniques, du fait de la présence dans leur séquence d'une unique signature WC(G/P)PC, s'élève ainsi à une vingtaine chez *Arabidopsis*. Les différentes isoformes ont été classées en plusieurs groupes, sur la base de leurs similarités de séquence et leur structure génique (intron/exon) (Meyer et al., 2002).

Les TRX h, au nombre de neuf, définissent majoritairement le groupe des thiorédoxines cytosoliques, la TRX h2 étant aussi adressée à la mitochondrie, et les deux TRX o, le groupe des thiorédoxines mitochondriales, bien que la TRX o2 ait également été suggérée cytosolique. Dans les plastides, neuf isoformes ont été identifiées : quatre de type m, deux de type f, une unique de type x et deux de type y (Figure 4). Les thiorédoxines cytosoliques et mitochondriales ont principalement été étudiées par le groupe initialement mené par Yves Meyer (Université de Perpignan) et les thiorédoxines plastidiales par le groupe initialement mené par Myroslawa Miginiac-Maslow (mon laboratoire d'accueil).

1) Les thiorédoxines hétérotrophes

a) Les thiorédoxines de type h

Huit des neuf TRX h sont réparties en trois sous-groupes, auxquelles s'ajoute la TRX h10 qui n'a pas encore été caractérisée, non classée et qui présente une signature WCVPC.

- Le sous-groupe I réunit les TRX h1, TRX h3, TRX h4 et TRX h5, dont la réduction est réalisée par le système NTRB. Au sein de ce groupe, la TRX h3 est la seule qui présente une signature WCPPC.
- Le sous-groupe II est composé des TRX h2, TRX h7 et TRX h8. Ces isoformes présentent toutes la signature WCGPC ainsi qu'une extension en position N-terminale. Elles sont réduites par le système NTRB.
- Le sous-groupe III, auquel appartient la TRX h9. Cette isoforme, qui porte la signature WCGPC, présente également une extension en position N-terminale contenant un résidu cystéine supplémentaire en 4^{ème} position.

Une analyse de l'expression de ces thiorédoxines indique que leur niveau d'expression varie selon l'isoforme considérée, les TRX h7, TRX h8 et TRX h9 étant les moins

abondamment exprimées (Reichheld et al., 2002). Par ailleurs, le profil d'expression de ces isoformes diffère : par exemple, les isoformes du sous-groupe I sont préférentiellement exprimées dans la sève du phloème (Ishiwatari et al., 1995; Sasaki et al., 1998).

De nombreuses études concernant le rôle des TRX du type h indiquent que celles-ci régulent des enzymes impliquées dans les réponses aux stress oxydants telles que les peroxyrédoxines (PRX) (Verdoucq et al., 1999) et jouent un rôle important dans les graines en développement et lors du processus de germination (Serrato and Cejudo, 2003; Shahpiri et al., 2008). Les TRX h jouent également un rôle dans les réponses de défense aux stress biotiques : pour exemple, l'expression de la TRX h5 est induite en réponse à la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* (Laloi et al., 2004) et, plus récemment, il a été montré que la TRX h5 est responsable de la réduction des ponts disulfure inter-moléculaires de NPR1, permettant ainsi sa relocalisation au noyau lors du déclenchement de la voie de l'acide salicylique après une attaque pathogène (Tada et al., 2008). De plus, une étude récente a montré que la victorine, un effecteur produit par le champignon necrotrophe *Cochliobolus victoriae*, peut se lier à la TRX h5. La protéine LOV1, une protéine de la famille des NB-LRR (Nucleotide-binding Leucine-Rich Repeat), est ainsi activée ce qui provoque la sensibilité de la plante au champignon *C. victoriae* (Lorang et al., 2012).

Étonnamment, une récente étude a montré que la TRX h9 pouvait être localisée au niveau de la membrane plasmique et être impliquée dans la croissance cellulaire, avec la capacité de se déplacer de cellule à cellule, suggérant un rôle dans la communication cellulaire (Meng et al., 2010).

b) Les thiorédoxines de type o

Seules deux isoformes de TRX de type o ont été identifiées, chacune portant la signature WCGPC et présentant une activité d'oxydoréductase. Malgré l'identification d'un peptide d'adressage aux mitochondries en position N-terminale, seule la localisation subcellulaire mitochondriale de la TRX o1 a été expérimentalement démontrée (Laloi et al., 2001). La localisation subcellulaire de la TRX o2 n'a jamais été démontrée mais son adressage aux mitochondries pourrait être compromis par la présence d'un intron supplémentaire en position N-terminale. De ce fait, il a été suggéré qu'elle serait cytosolique.

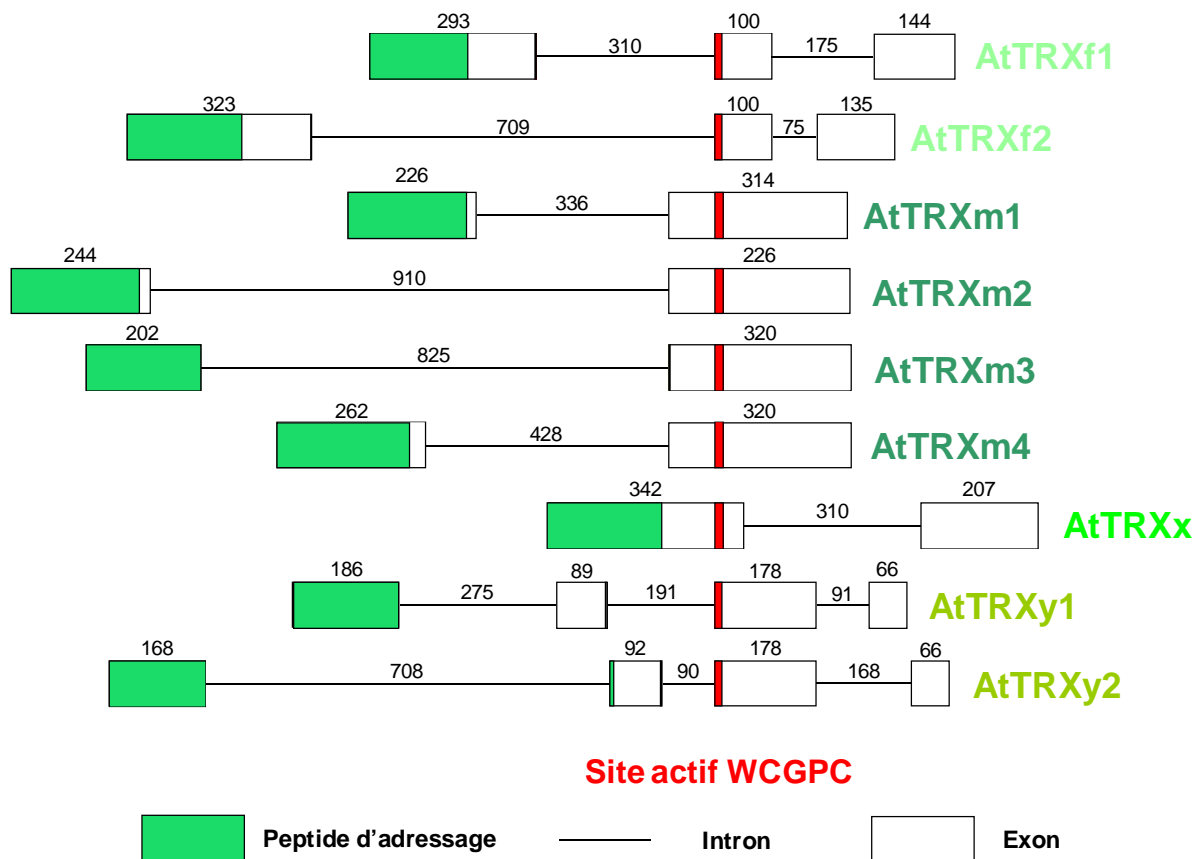


Figure 5: Structure des gènes codant les thiorédoxines plastidiales chez *Arabidopsis thaliana*.

Le peptide d'adressage prédit de chaque thiorédoxine est indiqué en vert. La séquence codant la signature WCGPC est indiquée en rouge. Les tailles des introns et des exons sont données en paires de bases.

Par ailleurs, une thiorédoxine réductase, NTRA, homologue à celle identifiée dans le cytoplasme des cellules végétales, est localisée dans les mitochondries, ce qui indique l'existence d'un système thiorédoxine/ thiorédoxine réductase complet et fonctionnel dans ces organites.

2) Les thiorédoxines plastidiales

Chacun des types de thiorédoxines plastidiales présente une structure génique intron/exon caractéristique, les isoformes d'un même type ayant la même structure (Figure 5).

a) Les thiorédoxines de types f et m

Les TRX de types f et m ont été les premières thiorédoxines chloroplastiques isolées à partir de feuilles d'épinard (Buchanan et al., 1978). Ces thiorédoxines sont impliquées dans la régulation à la lumière de l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme carboné telles que les enzymes du cycle de Calvin-Benson (GAPDH, PRK, SBPase), la MDH à NADP, la G6PDH ou l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), enzyme impliquée dans la synthèse de l'amidon (Figure 6). L'activation de la FBPase est cependant strictement régulée par les TRX de type f (Collin et al., 2003), de même que celle de la GAPDH (Marri et al., 2009) (Figure 6).

La distinction entre les TRX de types f et m, outre leur spécificité fonctionnelle, vient également de leur structure génique (Figure 5) et de leur structure primaire. En effet, les TRX de type f présentent, dans la région C-terminale de leur séquence protéique, un troisième résidu cystéine, en plus des deux résidus présents au site actif. Il a été montré que ce résidu cystéine, très conservé chez différents organismes, peut être glutathionylé (glutathionylation) (Michelet et al., 2005). L'ajout d'une molécule de glutathion (GSH) sur cette cystéine supplémentaire perturbe la réduction de la TRX f1 par le système de réduction FTR, ce qui a pour conséquence d'affecter la régulation de l'activité des enzymes par la TRX f1 à la lumière. Les TRX de type f sont, à ce jour, les seules thiorédoxines plastidiales à être glutathionylées.

Une expérience de complémentation d'une souche de levure déficiente en thiorédoxine par les TRX de type m a mis en évidence que les TRX m1, m2 et m4 induisent une tolérance

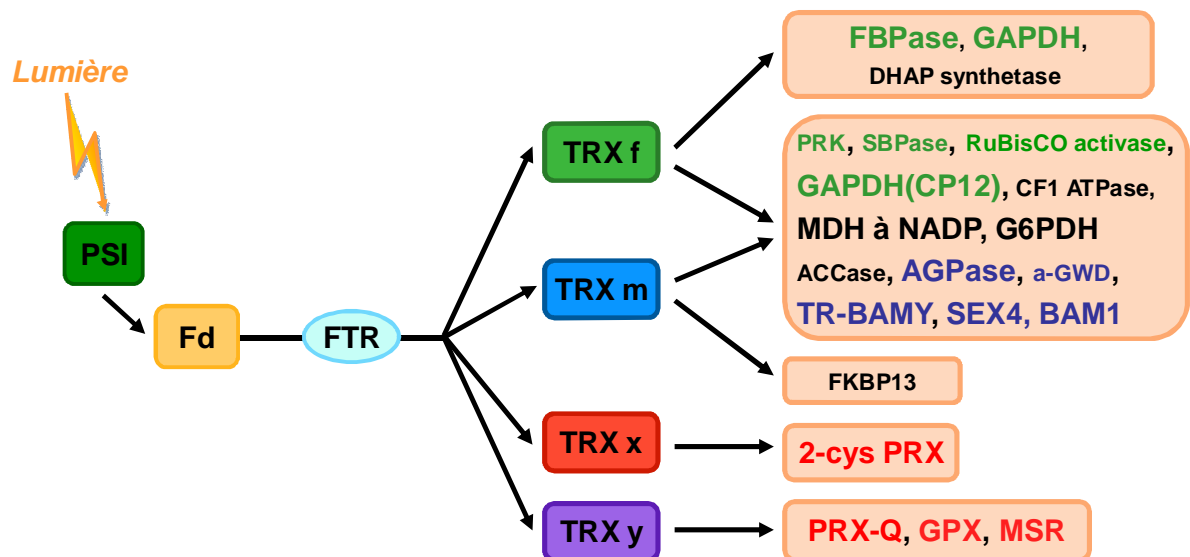


Figure 6 : Cibles des thiorédoxines plastidiales d'Arabidopsis, validées par approches biochimiques.

GAPDH (CP12) : Glycéraldéhyde-3-phospho déshydrogénase ; PRK : Phosphoribulokinase (Marri et al., 2009) ; RuBisCO Activase (Zhang and Portis, 1999) ; G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase (Née et al., 2009) ; ACCase : Acétyl CoA carboxylase (Sasaki et al., 1997) ; AGPase : ADP-glucose pyrophosphorylase (Thormählen et al., 2012) ; α-GWD : α-Glucan, Water Dikinase (Mikkelsen et al., 2005) ; TR-BAMY : Thioredoxin-Regulated Beta-Amylase (Sparla et al., 2006) ; SEX4 : Starch Excess 4 (Phosphoglucan phosphatase) (Silver et al., 2012) ; BAM1 : Beta-Amylase 1 (Valerio et al., 2011) ; FKBP13 : Immunophiline de type FKBP (Gopalan et al., 2004) ; 2-Cys PRX, MDH à NADP, FBPase (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004) ; PRX-Q (Lamkemeyer et al., 2006) ; GPX : Glutathione Peroxidase (Navrot et al., 2006) ; MSR : Methionine Sulfoxide Reductase (Vieira Dos Santos et al., 2007).

Enzymes du cycle de Calvin ; enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon ; enzymes impliquées dans la régulation des stress oxydatifs.

aux stress oxydatifs tandis que, lorsque la souche est complétée par la TRX m3, celle-ci devient hypersensible à ce même stress (Issakidis-Bourguet et al., 2001).

Les TRX de types f et m, exceptée la TRX m3, apparaissent donc comme des régulateurs de l'activité d'enzymes du métabolisme primaire carboné et azoté.

b) Les thiorédoxines de types x et y

Ces deux types de thiorédoxines, d'origine procaryote, ont été identifiés bien après les TRX de types f et m, notamment grâce à l'essor de la génomique. En effet, contrairement aux TRX f et m, elles ne sont pas capables d'activer la plupart des enzymes du métabolisme carboné, et n'ont donc pas pu être mises en évidence par les tests d'activité classiques. C'est après avoir été clonées et produites en tant que protéines recombinantes qu'elles ont pu faire l'objet d'analyses biochimiques spécifiques.

L'unique TRX x, dont les transcrits s'accumulent principalement dans les organes photosynthétiques (Mestres-Ortega and Meyer, 1999), joue le rôle de donneur d'électrons pour la peroxyrédoxine à 2 cystéines (2-Cys PRX), son efficacité vis-à-vis de cette enzyme étant la plus forte parmi toutes les thiorédoxines plastidiales (Collin et al., 2003) (Figure 6).

Les TRX de type y ont été initialement identifiées chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemaire et al., 2003), qui ne comporte qu'une seule isoforme de TRX y. Chez *Arabidopsis*, il existe deux isoformes (TRX y1 et y2), dont la localisation aux plastes a été démontrée (Collin et al., 2004). Les TRX de type y sont impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs via la régulation de deux peroxyrédoxines plastidiales : la 2-Cys PRX et la PRX Q, leur efficacité vis-à-vis de cette dernière étant bien meilleure (Figure 6). L'analyse du profil d'expression de ces deux isoformes a également révélé que la TRX y1 est principalement exprimée dans les plastes non photosynthétiques tandis que la TRX y2 est exprimée dans les organes photosynthétiques. Cela suggère donc que ces deux isoformes jouent un rôle différent, la TRX y1 pouvant jouer un rôle dans les organes non photosynthétiques tels que les graines.

3) Les « thioredoxin-like »

En plus de ces vingt thiorédoxines canoniques décrites chez *Arabidopsis* s'ajoutent maintenant les gènes codant des thiorédoxines avec un site actif atypique CXXC ou CXXS, ainsi que des protéines de masse moléculaire supérieure à 12-14 kDa ayant au moins un domaine « thioredoxin-like », amenant à 42 le nombre de thiorédoxines chez *Arabidopsis*. L'ensemble est classé en 15 sous-groupes, sur la base des homologues de séquences, avec plusieurs membres dans chaque sous-groupe (voir pour revue Meyer et al., 2012). Parmi ces protéines « thioredoxin-like », certaines d'entre elles, telles que CDSP 32 (« Chloroplastic Drought-induced Stress Protein 32 kDa »), NTRC (« NADPH-dependent Thioredoxin Reductase ») ou HCF164 (« High Chlorophyll Fluorescence 164 »), sont plastidiales et ont été caractérisées.

CDSP 32, qui comporte deux domaines thiorédoxine, est induite en conditions de stress hydrique. CDSP 32 semble capable de réduire la 2-Cys PRX et la PRX Q (Rey et al., 1998; Broin et al., 2000; Broin et al., 2002; Broin and Rey, 2003; Rey et al., 2005). La NTRC, une protéine bipartite plastidiale constituée d'un module NADPH-Thioredoxin Reductase (NTR) fusionné à un module thiorédoxine, tous deux actifs, est un réducteur très efficace de la 2-Cys PRX et a aussi été proposée comme système de réduction alternatif des thiorédoxines plastidiales (Serrato et al., 2004; Pérez-Ruiz et al., 2006). CDSP 32 ainsi que la NTRC apparaissent donc nécessaires à la protection de l'appareil photosynthétique lors d'un stress photooxydatif. HCF164 est une « thioredoxin-like » ancrée aux membranes des thylacoïdes et est requise pour la biogenèse du cytochrome b_6/f (Lennartz et al., 2001). Une autre « thioredoxin-like » nommée CITRX semble jouer un rôle dans la résistance aux pathogènes chez la tomate (Rivas et al., 2004).

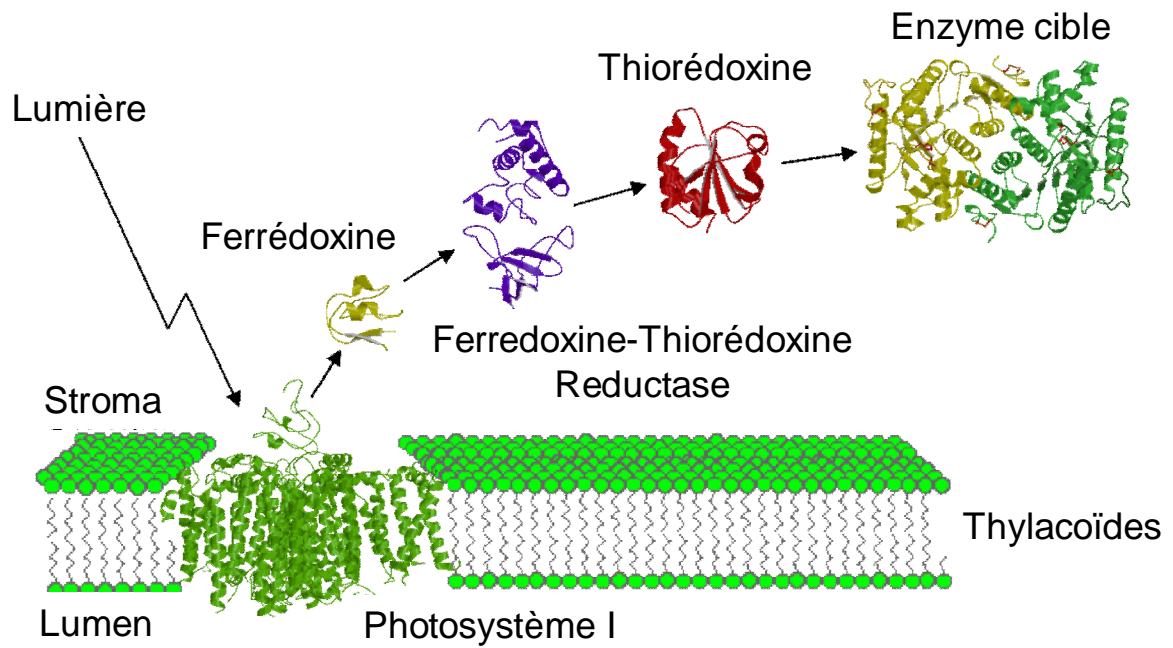


Figure 7 : Le système ferrédoxine/ thiorédoxine (d'après Johansson et al., 1999)

A la lumière, le photosystème I transmet les électrons à la ferrédoxine. Alors réduite, celle-ci va réduire la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) qui a son tour pourra réduire la thiorédoxine. Une fois réduite, la thiorédoxine peut alors activer par réduction sa cible.

III. Les systèmes de réduction connus des thiorédoxines

A. Le système NADPH thiorédoxine réductase (NTR)

Dans ce système, l'enzyme NADPH-thiorédoxine réductase (NTR) utilise le NADPH pour réduire la thiorédoxine. Initialement identifiée chez *Escherichia coli*, la NTR d'*Arabidopsis thaliana* présente 45% d'identité avec son homologue procaryote. Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour deux isoformes de la NTR qui présentent, en position N-terminale, une séquence signal permettant un double adressage au cytoplasme et à la mitochondrie. Cependant, il a été montré que la NTRA est majoritairement exprimée dans le cytosol tandis que la NTRB l'est dans les mitochondries (Reichheld et al., 2005).

La NTR est une flavoprotéine homodimérique qui présente une capacité d'oxydoréductase de ponts disulfure (Russel and Model, 1988). Chaque sous-unité de l'enzyme présente un domaine à FAD et un domaine à NADPH ainsi qu'un pont disulfure redox actif (Jacquot et al., 1994). Le NADPH va réduire le FAD qui, à son tour, pourra réduire le pont disulfure. Il en résulte un changement conformationnel de la protéine afin de permettre la réduction de la thiorédoxine par échange de groupements thiols-disulfure entre la réductase et la thiorédoxine (Waksman et al., 1994; Lennon, 2000).

B. Le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR)

Le système FTR est présent chez les organismes photosynthétiques uniquement, particulièrement dans les chloroplastes. A la lumière, lors du transfert des électrons au sein des thylacoïdes, le photosystème I (PSI), une fois réduit, transfère ses électrons à la ferrédoxine (Fd). La Fd réduite réduit alors la FTR qui pourra ensuite réduire la thiorédoxine (Figure 7).

i. La ferrédoxine

La ferrédoxine est une petite protéine à centre fer-soufre [2Fe-2S] qui accepte les électrons du photosystème I afin de réduire, entre autres, la ferrédoxine-NADPH réductase

(FNR) et la FTR. Chez *Arabidopsis*, quatre isoformes de ferrédoxine ont été identifiées et sont exprimées dans les chloroplastes des organes photosynthétiques (Fd1 et Fd2) ou les plastes non photosynthétiques (Fd3 et Fd4) (Hanke et al., 2004).

ii. La ferrédoxine-thiorédoxine réductase

La FTR est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique, la sous-unité FTR B, d'environ 12 kDa, et une sous-unité régulatrice, la sous-unité FTR A, de masse variable (7 à 13 kDa, selon les espèces). La FTR présente dans sa séquence six résidus cystéine dont quatre sont impliqués dans la formation du centre fer-soufre [4Fe-4S] ; les deux résidus restants permettent la formation d'un pont disulfure réductible en dithiol au niveau du site actif de l'enzyme (Chow et al., 1995). Le centre fer-soufre et le pont disulfure sont situés de part et d'autre de l'enzyme afin de faciliter son fonctionnement : en effet, la sous-unité catalytique de la FTR interagit simultanément avec la ferrédoxine, au niveau de son centre fer-soufre, et la thiorédoxine, au niveau de son pont disulfure (Dai et al., 2004).

C. Le système de réduction GSH/GRX

Chez le peuplier, il a été montré que certaines thiorédoxines cytosoliques de type h, qui ne peuvent pas être réduites par le système de réduction NTR dans le cytosol, peuvent être réduites par le système GRX/GSH. Dans ce système, la glutarédoxine est réduite par le glutathion (GSH). Le pool de glutathion est quant à lui maintenu à l'état réduit grâce à l'activité de la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme pouvoir réducteur (Gelhaye et al., 2003).

IV. Cibles des thiorédoxines

La multiplicité des isoformes de thiorédoxines identifiées chez les plantes supérieures soulève la question de la redondance fonctionnelle ou de la spécificité de ces protéines et a abouti à une situation paradoxale. En effet, le nombre de cibles connues, estimé à 16 par Buchanan et Balmer (2005), était devenu inférieur au nombre de gènes codant des thiorédoxines chez *Arabidopsis*.

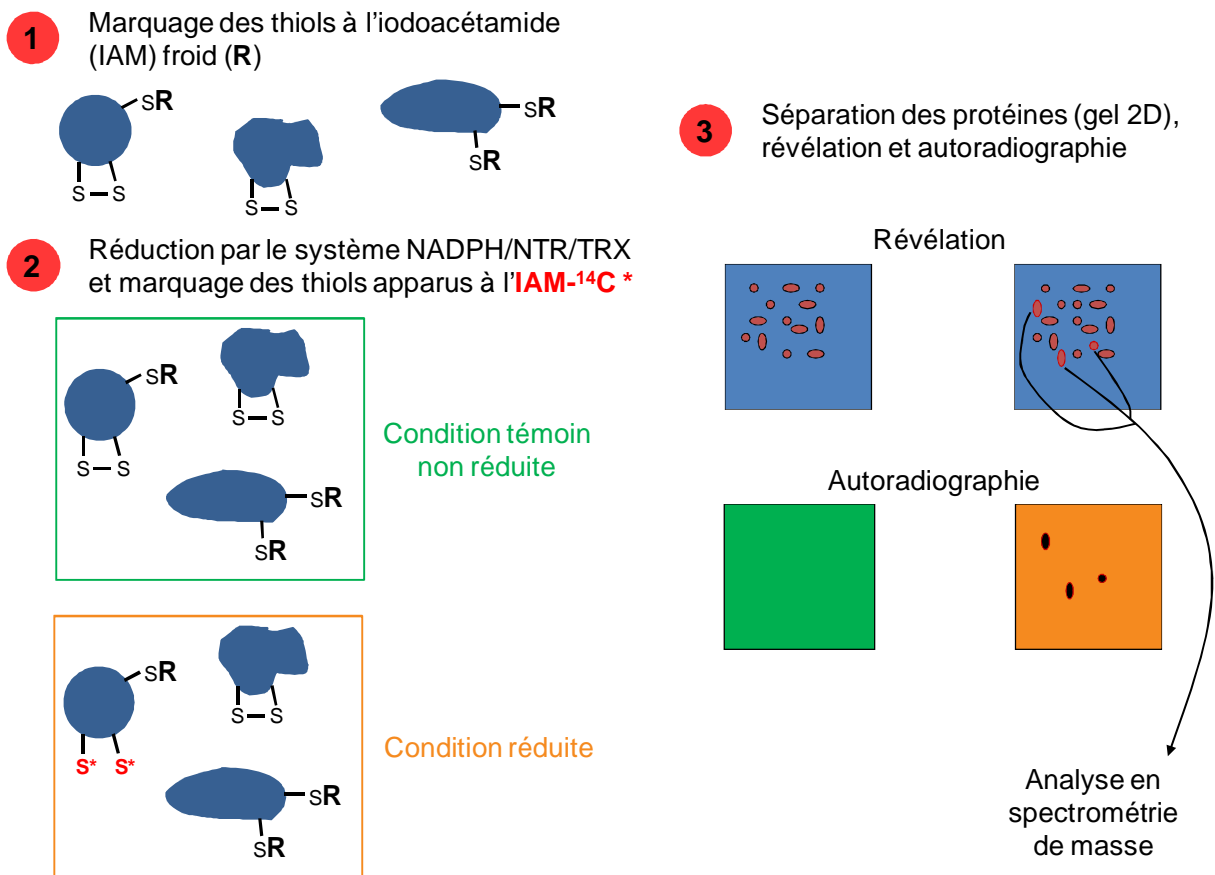


Figure 8 : Principe de la méthode du réductome utilisant l'iodoacétamide radiomarqué (¹⁴C-IAM).

Dans un premier temps, le mélange protéique est incubé en présence d'IAM froid (R) : les thiols libres accessibles vont ainsi être alkylés et bloqués (1). Par la suite, le mélange protéique est réduit in vitro par le système NTR/TRX en présence de NADPH et les thiols réduits nouvellement apparus sont ensuite marqués à l'IAM-¹⁴C (2). Un échantillon de ce même extrait protéique n'est pas réduit (condition témoin). Par la suite, les deux échantillons sont séparés sur gel bidimensionnel, les protéines sont révélées et la radioactivité des protéines radiomarquées est révélée par autoradiographie (3). Les protéines spécifiquement radiomarquées sont ensuite analysées par spectrométrie de masse.

Cela suggérerait donc que de nombreuses autres cibles des thiorédoxines restaient à identifier. Depuis, de nombreuses recherches de cibles des thiorédoxines dans différents organismes et dans différents compartiments subcellulaires ont ainsi permis, par des approches protéomiques diverses auxquelles mon laboratoire d'accueil a largement participé, d'identifier une multitude de cibles des thiorédoxines, le nombre de cibles potentielles identifiées s'élevant désormais à plus de 400 (dont une centaine sont plastidiales).

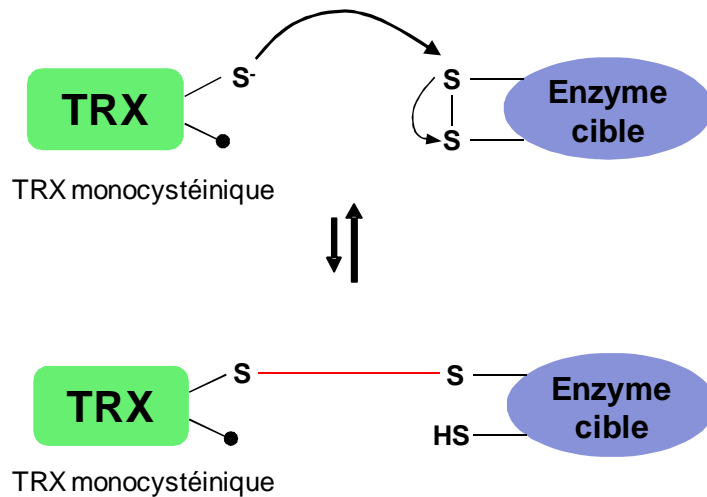
A. Recherche de cibles de thiorédoxines

1) Méthode du « réductome »

Le principe général de cette méthode est de réaliser un marquage spécifique des cibles, après réduction *in vitro* par une thiorédoxine, dans un mélange protéique complexe. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des sondes fluorescentes telles que le monobromobimane (mBBr) et le Cy5 maléimide (Cy5m), ou des sondes radioactives telles que l'iodoacétamide (IAM) et l'iodoacétate (IAA) radiomarqués (^{14}C). Cette dernière technique, plus sensible, mise au point à l'IBBMC (Orsay) dans l'équipe de Pierre Le Maréchal et Paulette Decottignies, est résumée en Figure 8.

Cette méthode d'identification de protéines cibles est très spécifique du fait de l'utilisation du système NTR/TRX pour réduire *in vitro* les cibles potentielles de la thiorédoxine dont on recherche les cibles.

Cette approche (sondes mBBr ou Cy5m, plus sensible) a permis d'identifier au total environ 70 cibles des TRX de type h dans les graines chez l'orge, le blé et l'arachide (Yano et al., 2001; Marx et al., 2003; Wong et al., 2003; Maeda et al., 2004). Leur identification souligne bien le rôle majeur des thiorédoxines dans les graines et ouvrent la voie à des études permettant de mieux comprendre la fonction des thiorédoxines au cours du développement et de l'étape de maturation des graines mais également lors du processus de germination. L'utilisation des sondes radiomarquées (IAM et IAA) pour la recherche de cibles dans un extrait protéique de feuilles d'*Arabidopsis* a permis d'identifier 45 cibles potentielles,



Pont disulfure mixte stable

Figure 9 : Principe de la colonne monocystéinique.

L'identification de cibles potentielles des thiorédoxines sur colonne de thiorédoxine monocystéinique repose sur le mécanisme de réduction d'une enzyme cible par une thiorédoxine. Lors de l'attaque nucléophile du premier résidu cystéine réduit sur le pont disulfure de la cible oxydée, un pont intermoléculaire mixte se forme entre la thiorédoxine et sa cible. La mutation du deuxième résidu cystéine de la thiorédoxine empêche l'attaque nucléophile de celui-ci sur le premier résidu cystéine de la thiorédoxine : le pont disulfure mixte créé entre la thiorédoxine et sa cible est alors stabilisé. Lors de la recherche de cibles de thiorédoxines sur colonne de thiorédoxine monocystéinique, les cibles potentielles sont ainsi retenues via ces ponts disulfures qui ne peuvent être réduits qu'en présence de DTT.

dont la moitié sont nouvelles, impliquées dans le métabolisme, les réponses de défense aux stress oxydatifs, la photosynthèse ou la synthèse d'acides aminés (Marchand et al., 2004).

Bien que très spécifique, cette technique ne s'applique cependant pas à la recherche de cibles des thiorédoxines plastidiales, leur système de réduction (Fd/FTR) étant trop compliqué à mettre en place *in vitro* pour ce type d'approche.

2) Colonne d'affinité monocystéinique

Cette méthode d'identification de cibles de thiorédoxines est basée sur le mécanisme réactionnel par lequel une thiorédoxine réduite va réduire une cible oxydée. Ici, le deuxième résidu cystéine régulateur du site actif WC(G/P)PC est muté, en résidu sérine généralement. Ainsi, lors de l'attaque nucléophile de la première cystéine sur la cible, le pont mixte intermoléculaire qui se forme entre la thiorédoxine et la cible ne peut être réduit puisque la deuxième attaque nucléophile sur ce pont mixte ne peut avoir lieu. Ainsi, il se forme un pont stable entre la thiorédoxine et la cible potentielle (Figure 9). Les enzymes cibles vont être liées de façon covalente à la thiorédoxine monocystéinique et éluées en présence de dithiothréitol (DTT_{red}).

Cette technique a ainsi permis de valider des cibles connues des thiorédoxines (GAPDH, SBPase, ...) mais a également permis l'identification d'une multitude de nouvelles cibles potentielles des thiorédoxines, aussi bien dans les organes photosynthétiques (Motohashi et al., 2001; Goyer et al., 2002; Bartsch et al., 2008) que non photosynthétiques tels que les racines (Marchand et al., 2010). Le mécanisme réactionnel des glutarédoxines étant similaire à celui des thiorédoxines, cette technique a également été utilisée pour l'identification de cibles putatives des glutarédoxines.

Cet outil, bien que très avantageux et largement utilisé, s'est toutefois avéré être peu spécifique. En effet, du fait de la mutation du deuxième résidu cystéine du site actif, l'interaction entre la thiorédoxine ou la glutarédoxine est forcée. De ce fait, la spécificité d'interaction thiorédoxine-cible est fortement diminuée. De plus, une protéine contenant des résidus cystéine libres accessibles peut être retenue par la thiorédoxine ou la glutarédoxine monocystéinique sans être nécessairement régulée par une redoxine, d'où la nécessité de confirmer chaque cible par des tests biochimiques.

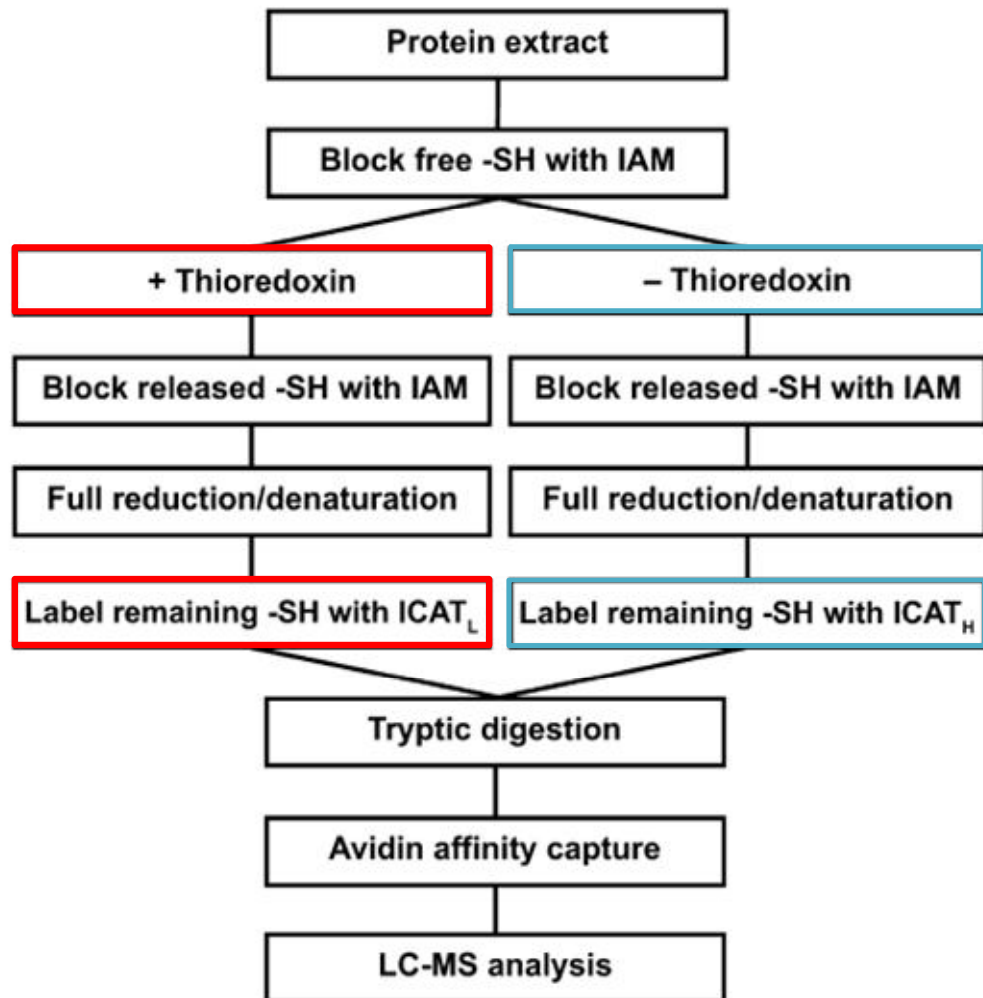


Figure 10 : Procédure expérimentale d'identification de cibles des thioredoxines par une approche protéomique quantitative utilisant les « isotopes-coded affinity tags » (ICAT) (d'après Hägglund et al., 2008).

Cependant, en combinant cette approche par colonne d'affinité à l'approche mBBR, lors de la recherche de cibles de la TRX h dans les graines de blé, 68 cibles putatives de la thiorédoxine ont été identifiées, dont 40 n'avaient jamais été identifiées auparavant, et dont seulement un tiers étaient communes aux deux approches. Cela souligne clairement l'aspect complémentaire de ces deux techniques et la nécessité de multiplier les approches employées lors d'une recherche de cibles de thiorédoxine.

3) Colonne d'interactions électrostatiques

Il est également possible d'isoler des cibles interagissant *via* des liaisons électrostatiques avec les thiorédoxines. Cette technique a été utilisée avec succès pour la recherche de cibles de la TRX f1 d'Arabidopsis. En effet, la TRX f peut former un complexe non covalent stable avec la FBPase (Crawford et al., 1986) mais, tout comme certaines cibles connues, la FBPase n'est pas retenue sur les colonnes de thiorédoxines monocystéiniques. Par contre, la FBPase est retenue sur colonne de TRX f1 sauvage par interactions électrostatiques (Balmer et al., 2004). Cette approche a également permis d'identifier 27 nouvelles protéines cibles de cette thiorédoxine, telles que des protéines liées aux acides nucléiques (ADN et ARN), des protéines impliquées dans la transcription des gènes, le métabolisme de l'azote, la biosynthèse de l'amidon et des acides gras, ou encore la synthèse de l'ATP.

4) Méthode de protéomique redox (ICAT)

Cette méthode, hautement spécifique et quantitative, est basée sur un marquage différentiel des thiols à l'aide d'étiquette d'affinité marquée (« isotope-coded affinity tag », ICAT). Le principe ici est de comparer le marquage des thiols entre un premier échantillon qui n'est pas réduit par une thiorédoxine (condition « - TRX ») et un deuxième qui l'est (condition « + TRX ») (Figure 10). Au préalable, les thiols libres dans les deux échantillons sont alkylés à l'IAM puis incubés en présence ou non de thiorédoxine. Les nouveaux thiols libres sont alkylés à l'IAM puis les extraits sont traités avec un réducteur chimique. Les résidus cystéines restants sont alors radiomarqués avec un isotope léger (^{12}C) (« + TRX ») ou

un isotope lourd (^{13}C) (condition « - TRX »). Le différentiel de marquage entre les deux conditions permet alors d'identifier les cibles de la thiorédoxine.

Cette technique, utilisée lors de la recherche de cibles de la TRX h1 dans les embryons de graines germées d'orge (Hägglund et al., 2008), a permis d'identifier une quarantaine de cibles, dont la 1-Cys PRX et la déhydroascorbate réductase (DHAR), identifiées auparavant comme cibles de TRX h chez le blé et chez *Arabidopsis thaliana*. De nouvelles protéines impliquées dans les processus de germination et d'accumulation des réserves dans la graine ont également été identifiées.

5) Criblage double hybride chez la levure

Une des méthodes les plus utilisées pour entreprendre une recherche de cibles d'une protéine d'intérêt est la technique du double hybride chez la levure, qui présente l'avantage de tester les interactions protéine-protéine *in vivo*. Cependant, les souches communément utilisées pour le double hybride ne permettent pas d'identifier des cibles spécifiques des thiorédoxines du fait de la présence des deux thiorédoxines endogènes (TRX 1 et TRX 2) qui pourraient, d'une part, réduire les ponts disulfure mixtes formés entre la thiorédoxine d'intérêt et la cible potentielle et, d'autre part, interagir directement avec les cibles putatives de la thiorédoxine d'intérêt.

Une souche de levure, nommée CY306, mutée pour ses deux thiorédoxines endogènes ($\Delta trx1\Delta trx2$), a été créée (Vignols et al., 2005), offrant ainsi la possibilité d'entreprendre des recherches de cibles de thiorédoxine dans un contexte *in vivo*, en utilisant comme appât une thiorédoxine monocystéinique ou sauvage.

Il est important de souligner que l'ensemble de ces méthodes d'identification de cibles des thiorédoxines sont complémentaires, bien que certaines présentent davantage de spécificité que d'autres. Il semble donc nécessaire de multiplier les approches d'analyse afin, d'une part, de valider chaque approche individuellement, et, d'autre part, d'être le plus exhaustif possible dans l'identification des cibles potentielles d'une thiorédoxine choisie.

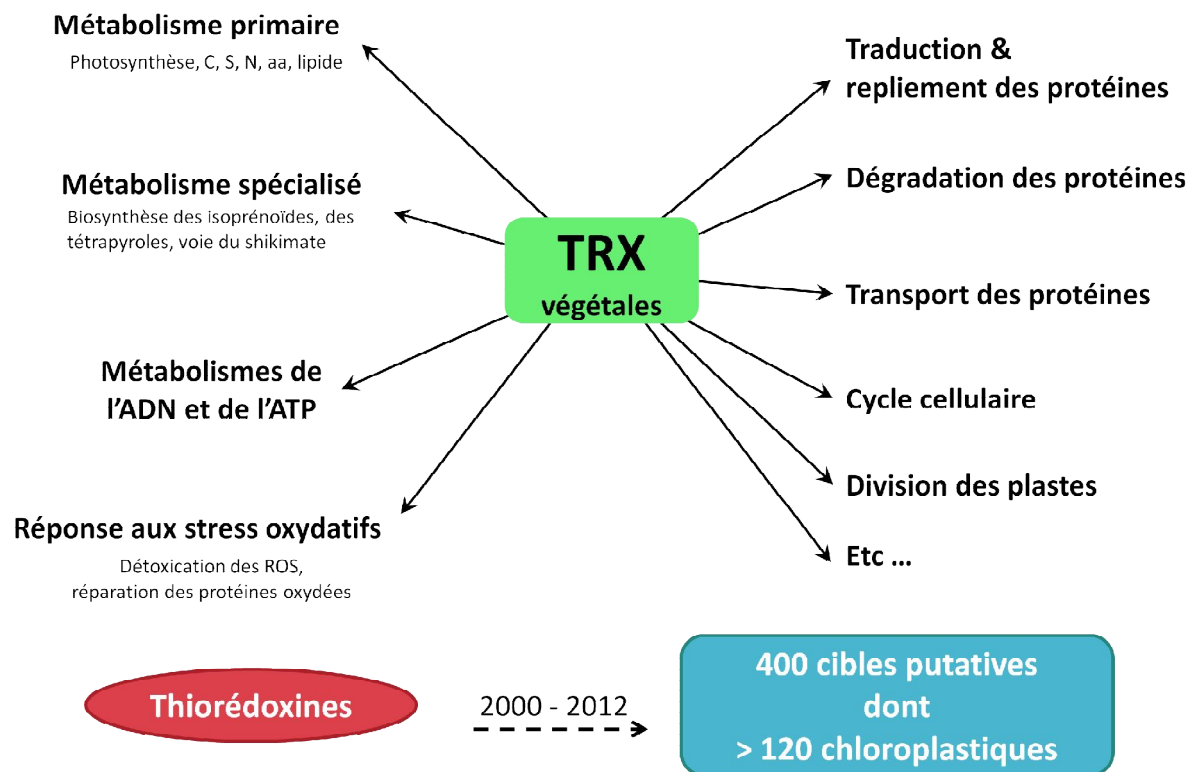


Figure 11 : Voies métaboliques et mécanismes cellulaires potentiellement régulés par les thiorédoxines chez les organismes photosynthétiques.

Les cibles putatives de thiorédoxines identifiées chez les organismes photosynthétiques sont impliquées dans la régulation du métabolisme primaire mais également dans la régulation des métabolismes spécialisés, de l'ATP ou de l'ADN ainsi que dans les voies de réponses aux stress oxydatifs. Par ailleurs, de nombreux autres processus biologiques (traduction, repliement et dégradation des protéines, cycle cellulaire, ...) semblent être régulés par les thiorédoxines, suggérant un rôle central de ces protéines dans la cellule.

B. Spécificité et redondance fonctionnelle des thiorédoxines plastidiales

Le développement des approches protéomiques ainsi que la sensibilité des différentes techniques désormais développées permettent une identification à plus grande échelle des cibles potentielles des thiorédoxines.

Un inventaire exhaustif de ces cibles potentielles a été récemment mise à jour par Montrichard et al. (2009). L'ensemble de ces données indiquent que les thiorédoxines sont potentiellement impliqués dans de nombreux métabolismes et processus différents faisant des thiorédoxines de potentiels régulateurs centraux de la cellule.

Diverses approches biochimiques, auxquelles mon laboratoire d'accueil a largement participé, ont été utilisées pour valider certaines cibles des thiorédoxines, ce qui a également permis d'aborder le problème de la spécificité des thiorédoxines. En effet, il est possible de tester *in vitro* la spécificité des thiorédoxines pour différentes enzymes cibles. Il faut pour cela disposer des différentes protéines purifiées à homogénéité : les thiorédoxines, les enzymes cibles et, dans certains cas, la ou les réductases. De nombreuses cibles des thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis* ont été validées par cette approche et ont permis de souligner que les TRX de types f et m sont préférentiellement des régulateurs d'enzymes impliquées, directement ou non, dans les métabolismes carbonés et azotés tandis que les TRX de types x et y sont davantage des substrats antioxydants (Figure 11).

Cependant, de récentes études ont révélé des fonctions tout à fait inattendues pour certaines thiorédoxines plastidiales. En effet, il a récemment été montré que la TRX m2 est partiellement retenue dans le cytosol et est impliquée dans l'hétérodimérisation de deux isoformes de G6PDH (G6PDH1 et G6PDH4). Ce dimère est ensuite adressé au peroxyosome, permettant un efficace cycle oxydatif des pentoses phosphates dans le peroxyosome (Meyer et al., 2011). Ceci indique, pour la première fois, que des précurseurs de thiorédoxines plastidiales peuvent être adressés à d'autres compartiments subcellulaires.

Un autre rôle surprenant pour une thiorédoxine plastidiale concerne l'implication de la TRX m3 dans le transport intercellulaire, *via* les plasmodesmes, essentiel au développement du méristème (Benitez-Alfonso et al., 2009). La TRX m3 a précédemment été montrée

comme étant atypique puisqu'elle est incapable de réduire la plupart des cibles réduites par les autres isoformes de TRX m (Collin et al., 2003). La seule exception connue à ce jour est sa faible capacité à réduire la G6PDH1 (Née et al., 2009).

Ces récentes données ouvrent la voie à une reconsidération du rôle des thiorédoxines plastidiales dans les plastes mais aussi, plus largement, dans les autres compartiments subcellulaires.

V. Objectifs de la thèse

En 2004, lors d'un criblage double hybride utilisant la protéine Cf-9 de tomate (*Solanum lycopersicum*) comme appât, une thiorédoxine putative (« thioredoxin-like ») a été identifiée (Rivas et al., 2004). Cette thiorédoxine, appelée CITRX (Cf-9-interacting thioredoxin), est impliquée dans les réponses de défense mises en place lors de l'interaction incompatible avec le pathogène *Cladosporium fulvum* qui exprime le gène d'avirulence Avr9. La CITRX, via son interaction avec le domaine C-terminal du « receptor-like » Cf-9, joue le rôle de régulateur négatif de la signalisation menant à la mort cellulaire programmée chez la tomate. En effet, en absence de CITRX, les réponses de défense mises en place lors de la reconnaissance Avr9/Cf-9 sont altérées : la réponse hypersensible (HR) est mise en place plus rapidement, la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) est augmentée, l'activité de protéines kinases telles que les « mitogen-activated protein kinases » (MAP kinases) est modifiée et l'expression de gènes de défense est accélérée (Rivas et al., 2004).

Par ailleurs, la protéine kinase ACIK1 (Avr9/Cf-9 induced kinase 1), identifiée un an plus tard, est nécessaire à la mise en place de la réponse hypersensible Avr9/Cf-9 dépendante (Rowland et al., 2005). Son identification a ainsi permis de préciser le rôle de la CITRX. Celle-ci joue en effet le rôle d'adaptateur entre le récepteur Cf-9 et la protéine kinase ACIK1 (Nekrasov et al., 2006). Lors de l'élicitation par le facteur Avr9, la CITRX recrute la kinase ACIK1 au niveau du récepteur Cf-9 pour permettre le déclenchement des réponses de défense chez la tomate, les activités catalytiques de la CITRX et de la protéine ACIK1 n'étant pas requises lors de l'interaction.

L'orthologue de la CITRX de tomate a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* et nommée TRX z. Bien que l'on supposait la CITRX comme cytosolique, plusieurs analyses du protéome chloroplastique identifient la TRX z parmi les protéines plastidiales (Kleffmann et al., 2004; Giacomelli et al., 2006; Pfalz et al., 2006). Par ailleurs, la TRX z a été identifiée comme substrat potentiel des MAPK kinases 3 et 6, protéines impliquées dans la régulation de l'expression de gènes en réponse à un stress biotique ou abiotique (Feilner et al., 2005).

L'objectif de mon travail de thèse a été de réaliser la caractérisation biochimique et fonctionnelle de la TRX z d'*Arabidopsis*.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de valider et de confirmer la localisation aux plastides de cette nouvelle thiorédoxine. Par la suite, lorsque le peptide d'adressage de la TRX z a été identifié, j'ai tout d'abord cloné l'ADNc de la TRX z dans le but de produire et purifier la protéine recombinante mature, dépourvue de son peptide d'adressage, en vue de sa caractérisation biochimique. L'obtention de la protéine recombinante m'a ainsi permis de valider sa capacité d'oxydoréductase de ponts disulfure puis d'entreprendre la recherche de son système de réduction.

Dans un second temps, j'ai entrepris une recherche de cibles putatives de la TRX z. Deux approches complémentaires ont été suivies : en collaboration avec Paulette Decottignies (IBBMC, Orsay), une recherche de cibles de la TRX z par une première approche *in vitro* sur colonne d'affinité a été effectuée. Par ailleurs, en collaboration avec Florence Vignols (IRD, Montpellier), j'ai eu l'occasion de réaliser, au sein de son laboratoire, une recherche de cibles de la TRX z par criblage double hybride en système levure (approche *in vivo*).

Enfin, la caractérisation fonctionnelle *in planta* de la TRX z d'*Arabidopsis* a été débutée : tout d'abord, l'expression de la TRX z parmi toutes les thiorédoxines plastidiales a été analysée dans les différents organes de la plante et selon les conditions d'éclairement, plus particulièrement au cours du cycle circadien. Enfin, un mutant d'insertion pour la TRX z étant disponible au laboratoire, j'ai initié l'étude du rôle potentiel de la TRX z dans la réponse immune innée par génétique inverse.

Matériels & Méthodes

I. Matériels

A. Matériel procaryotique

1) *Escherichia coli*

a) Souches

Souche DH5 α F'

Cette souche bactérienne a le génotype : F', ϕ 80lacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*rk⁻*, *mk⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoRA*(*lacZYA-argF*), U169 (Hanahan, 1983). Cette souche, qui ne peut effectuer de recombinaison, a été utilisée pour les étapes de clonage et d'amplification de plasmides.

Souche BL21(DE3)

Cette souche bactérienne a le génotype : *hsdS*, *gal* (λ c *Its* 857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7 gene 1*), (Studier et Moffat, 1986). Cette souche a été utilisée pour l'expression et la production des protéines recombinantes dont les ADNc ont été clonés dans l'un des vecteurs d'expression de type pET (plasmid Expression with T7 RNA polymerase, Novagen).

b) Milieux de culture

Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu Luria-Bertani (LB) liquide (LB Broth Base, Invitrogen) sous agitation (1800 rpm) ou sur milieu solide gélosé (LB agar, Invitrogen). Ces milieux, préparés suivant les indications données par le fournisseur, sont stérilisés par autoclavage (20 min, 115°C). Afin de permettre la sélection des bactéries transformées, un antibiotique est ajouté au milieu après autoclavage. L'antibiotique utilisé est déterminé par le gène de résistance inséré dans le vecteur utilisé lors de la transformation des bactéries.

c) Vecteurs d'expression

Vecteur d'expression pET-16b

Le vecteur d'expression pET-16b est un vecteur commercial (Novagen) qui nous a été offert par Jean-Philippe Reichheld (Université de Perpignan). Ce vecteur est utilisé pour l'expression et la production des protéines recombinantes par la souche bactérienne BL21

(DE3). Il possède : (i) une origine de répllication bactérienne (ORI), permettant la répllication autonome du plasmide ; (ii) un gène de résistance (BLA) qui permet la sélection des bactéries transformées sur milieu additionné en ampicilline. Le promoteur, le site d'initiation de la transcription et le terminateur proviennent du gène 10 du phage T7 ($\phi 10$) (Figure 12 A).

Vecteur d'expression pGENI

Ce vecteur d'expression a été récemment construit au laboratoire (GENI : Guillaume Emmanuelle Née Issakidis). C'est un dérivé du vecteur d'expression pET-16b. Une séquence codant pour l'étiquette *Strep*-Tag II (8 acides aminés : WSHPOFEK) a été intégrée dans le site multiple de clonage (Figure 12 B). Il présente donc l'avantage de contenir deux étiquettes différentes (His-Tag ou *Strep*-Tag). Les autres caractéristiques (gène de résistance, origine de répllication,...) sont identiques à celles du vecteur pET-16b.

2) *Saccharomyces cerevisiae*

a) Souches

Souche YRG2

Cette souche de levure commerciale (Stratagene, #240060) a le génotype : *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *leu2-3*, 112, *trp1-901*, *gal4-542*, *gal80-538*, *lys2::UAS_{GAL1}-TATA_{GAL1}-HIS3*, *URA3::UAS_{GAL4} 17MERS(x3)-TATA_{CYC1}-LacZ*..

Souche CY306

Cette souche de levure, dérivée de la souche commerciale YRG2, a le génotype : *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *leu2-3*, 112, *trp1-901*, *gal4-542*, *gal80-538*, *lys2::UAS_{GAL1}-TATA_{GAL1}-HIS3*, *URA3::UAS_{GAL4} 17MERS(x3)-TATA_{CYC1}-LacZ*, *trx1::KanMX4*, *trx2::KanMX4*. Cette souche est mutée pour les gènes codant les thiorédoxines endogènes de levure ($\Delta trx1\Delta trx2$) (Vignols et al., 2005). L'absence de thiorédoxines fonctionnelles chez cette souche entraîne un défaut d'assimilation du sulfate nécessaire à la synthèse de méthionine. Il est donc indispensable d'ajouter de la méthionine au milieu de culture pour permettre la croissance de la souche CY306.

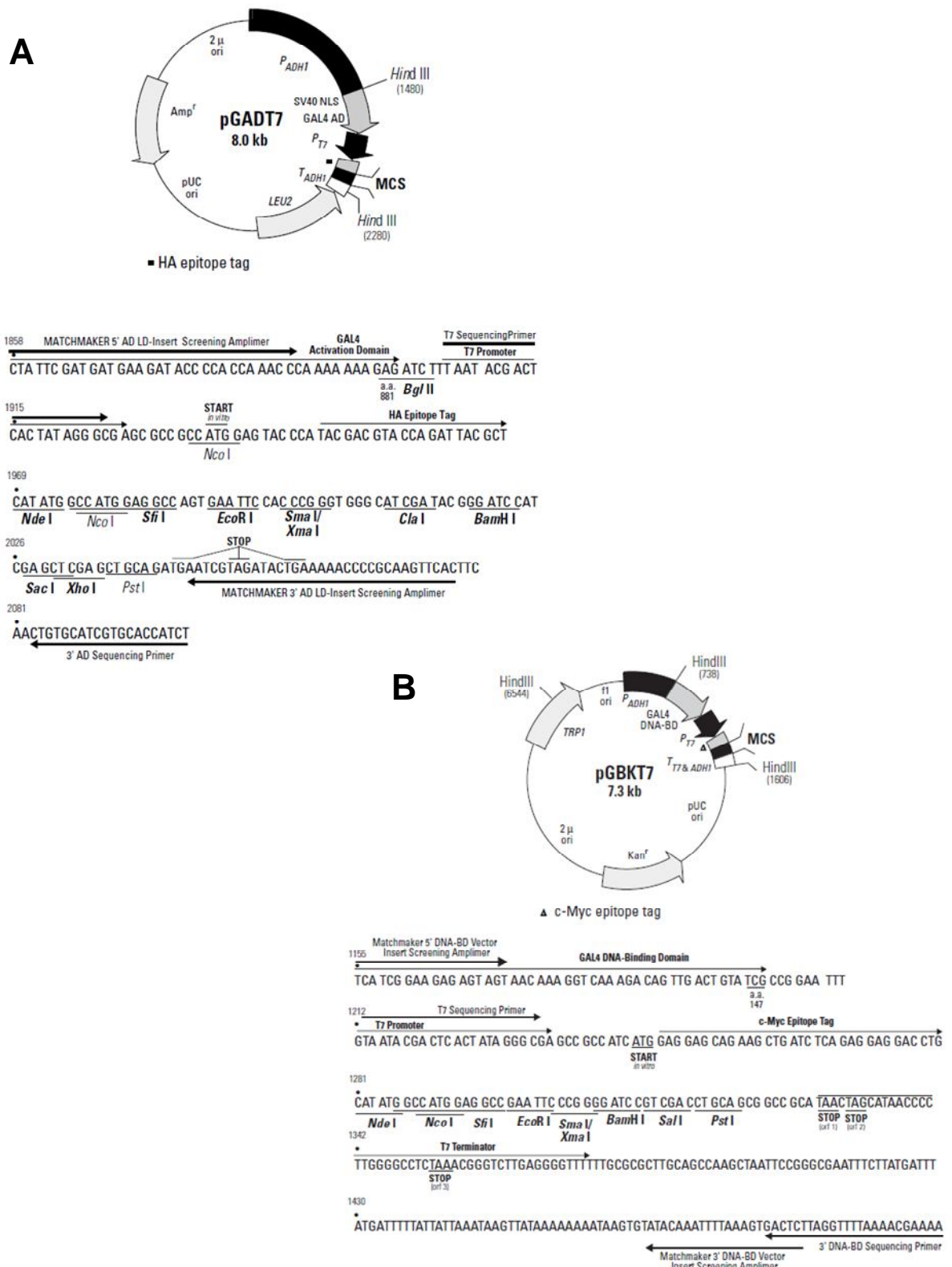


Figure 13 : Carte et sites multiples de clonage des vecteurs d'expression pGAD-T7 (A) et pGBK-T7 (B) (Clontech).

b) Milieux de culture

Les levures sont cultivées à 30°C sous agitation en milieu « Yeast Nitrogen Base » (YNB) liquide dépourvu d'acides aminés ou sur milieu solide (YNB agar). Ces milieux sont stérilisés par autoclavage (30 minutes, 110°C). Les acides aminés et bases nécessaires à la croissance des souches de levures YRG2 et CY306, ajoutés au milieu de culture liquide ou solide, sont : L-Histidine (H), Uracile (U), L-Lysine (K), Adénine (A), L-Leucine (L) et L-Tryptophane (W) (Sigma). Pour la souche CY306, il est nécessaire d'ajouter également de la L-Méthionine (M). La composition des milieux est détaillée en Annexe 1-.

c) Vecteurs d'expression pGAD-T7 et pGBK-T7

Les vecteurs utilisés pour le clonage de l'ADNc de TRX z lors de la recherche de cibles en système levure sont les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 (Clontech, Figure 13).

Le vecteur pGADT7 permet d'exprimer la protéine recombinante TRX z fusionnée au domaine d'activation de la transcription du gène GAL4 (domaine AD). Il possède : (i) une origine de répllication bactérienne (pUC) et une origine de répllication de levure (2μ ori) permettant la répllication autonome du plasmide ; (ii) un gène marqueur d'auxotrophie LEU2 permettant la sélection des levures transformées ; (iii) un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) permettant la sélection des bactéries transformées.

Le vecteur pGBKT7 permet d'exprimer la protéine recombinante TRX z fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du gène GAL4 (domaine DNA-BD). Comme le vecteur pGADT7, il possède les deux origines de répllication pUC et 2μ ori ainsi qu'un gène marqueur d'auxotrophie (TRP1) et un gène de résistance à la kanamycine (Kan^r) permettant la sélection des levures et des bactéries transformées.

B. Matériel végétal

1) Pois (*Pisum sativum*, variété merveille de Keveldon)

Les graines de pois sont semées sur vermiculite et les plants sont cultivés en serre, en jours longs, pendant 3 à 4 semaines. En vue de l'isolation des thylacoïdes, les plants de pois sont placés à l'obscurité 24 à 48 heures avant prélèvement.

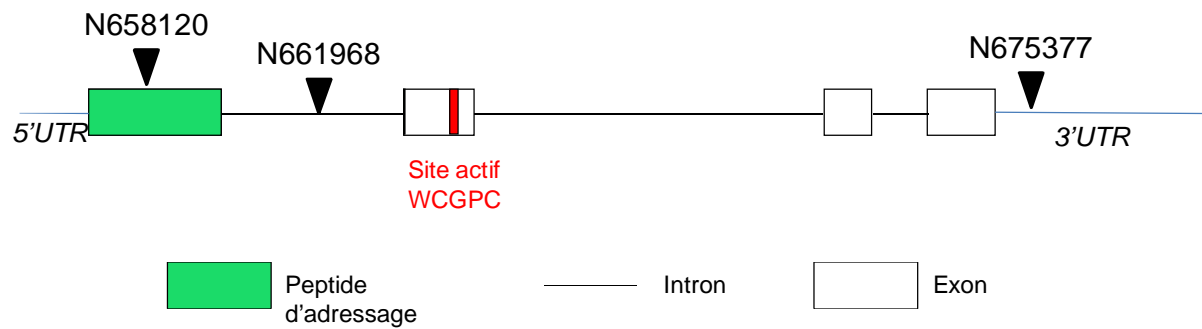


Figure 14 : Lignées d'insertion ADN-T pour le gène *TRX z* disponibles au laboratoire.

Trois lignées d'insertion dans le gène *TRX z*, obtenues auprès du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center), sont disponibles au laboratoire : la lignée N658120, dont l'insertion se situe dans le premier exon du gène, la lignée N661968, dont l'insertion se situe dans le premier intron du gène, et la lignée N675377, dont l'insertion se situe dans la région 3' UTR du gène.

2) *Arabidopsis thaliana*

a) Stérilisation des graines

La surface des graines est stérilisée avant d'effectuer les semis sur milieu MS gélosé. Une pastille de Javel (Bayrochlore, Bayrol) est dissoute dans 50 mL d'eau. Cette solution est diluée au 1/10^{ème} dans de l'éthanol 95%. Les graines sont incubées 7 min sous faible agitation dans cette solution puis sont lavées deux fois à l'éthanol 95%. Les graines sont ensuite séchées sous hotte stérile puis sont conservées à température ambiante ou semées. Dans ce dernier cas, la dormance des graines est levée par un traitement au froid (4°C) et à l'obscurité de 48 heures.

b) Conditions de culture des plantes sauvages

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia (Col-0), sont cultivées :

(a) *in vitro* pendant 2 semaines sur milieu MS gélosé (milieu Murashige et Skoog, 1962 (voir composition en Annexe 1) additionné d'agar spécial plantes (plant agar, Duchefa 9 g/L)) soit en conditions de jours courts (photopériode de 8 heures), soit à l'obscurité totale à 20°C en hygrométrie constante de 65%, ou

(b) en terreau, pendant 6 semaines, en enceinte phytotronique (Snijders) avec une photopériode de 12 heures/12 heures (22°C, 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ et 60% d'hygrométrie le jour ; 20°C et 60% d'hygrométrie la nuit).

c) Mutants d'insertion

Trois lignées mutantes d'insertion ADN-T dans le gène *trx z* issues du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) sont disponibles au laboratoire : la lignée N658120 dont l'insertion de l'ADN-T se situe dans le premier exon du gène ; la lignée N661968 dont l'insertion se situe dans le premier intron du gène et la lignée N675377 dont l'insertion se situe dans la région 3'UTR du gène (Figure 14).

Après stérilisation des graines, la culture est initiée *in vitro* sur milieu ½ MS gélosé supplémenté en saccharose 1% (p/v). La culture se fait pendant 2 semaines en jours courts (8 heures de photopériode) à faible lumière (60-70 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$, 60% d'humidité) pour permettre la photomixotrophie des plantes sans causer de chlorose. Les plantules sont

Nom	Séquences 5' → 3'	Sites de restriction
TRXz-up (sens)	AAACCATGGCAAATTGTCAGCTCAAGAACTTCAGG	<i>NcoI</i>
TRXz-dw (reverse)	TTTCTCGAGTTATTACATCTCGTTGTCAATGATATCGTGCATCATCTGTAACG	<i>XhoI</i>

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage pET-16b :: TRX z.

ensuite repiquées sur terreau et cultivées en enceinte phytotronique (22°C, 60% d'hygrométrie) en jours courts et en condition de faible lumière pendant 4 semaines.

II. Méthodes

A. Clonage, production et purification de TRX z non étiquetée

Il s'agit ici de cloner, produire et purifier la forme maturée (dépourvue du peptide d'adressage au chloroplaste, Lys79), et sans étiquette, de TRX z, dans le vecteur d'expression pET-16b, afin de ne pas risquer de modifier la conformation de la protéine recombinante et ainsi son activité.

1) Clonage

a) Amplification de l'ADNc TRX z par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN encadré par deux séquences connues. L'ADNc de la TRX z a été obtenu à partir du clone ABRC #DKLAT3G06730. L'ADNc a été amplifié avec la paire d'oligonucléotides TRXz-up et TRXz-dw (Tableau 1) qui permettent d'introduire un site de restriction *NcoI* et un site de restriction *XhoI* aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc respectivement. La validité des oligonucléotides a été vérifiée à l'aide du logiciel d'analyse pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>).

La réaction de PCR s'est faite en présence d'une polymérase thermostable haute fidélité, la *Pfu* DNA Polymerase (Promega).

Le milieu réactionnel (50 µL) contient : 100 à 500 ng de matrice d'ADN, 1mM de désoxyribonucléotides (dNTP), 5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce et 1,5 unités de *Pfu* DNA Polymerase. La PCR a été réalisée avec un thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 ou 9700 (Applied Biosystems) selon le programme suivant : (i) 5 minutes à 95°C ; (ii) 30

cycles de 3 étapes (1 minute à 95°C (dénaturation de l'ADN) ; 1 minute 30 à 56°C (hybridation des amorces) ; 2 minutes à 72°C (élongation)) ; (iii) 4 minutes à 72°C.

b) Electrophorèse en gel d'agarose

Les échantillons d'ADN (produits de PCR) sont mélangés au bleu de charge (Tris-HCl pH 7,9 100 mM, bleu de bromophénol 0,25% (p/v), EDTA 250 mM, glycérol 50% (p/v) ; à diluer 10 fois) puis déposés sur un gel d'agarose 1% (p/v) réalisé dans du tampon TAE 1X (Tris Acétate pH 7,0 40 mM ; EDTA 1 mM) additionné de bromure d'éthidium (BET) à une concentration de 0,1 µg/mL, un agent s'intercalant entre les bases de l'ADN qui fluoresce sous UV. Les échantillons sont séparés en fonction de leur taille dans un champ électrique à 120 V dans du tampon TAE 1X. L'ADN est ensuite visualisé sous transilluminateur UV. La taille et la quantité des fragments d'ADN analysés sont estimées à l'aide du marqueur de taille SmartLadder (5 µL) (Eurogentec) qui migre avec les échantillons.

Ici, après migration, le fragment d'intérêt TRX z (insert) est extrait du gel puis purifié avec le kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

c) Dosages des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont dosés par spectrophotométrie au NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). La concentration de l'échantillon est calculée selon la correspondance 1 unité d'absorbance à 260 nm équivaut à une concentration de 50 µg/µL d'ADN double brin.

d) Restriction de l'ADN

Les digestions de l'insert et du vecteur par les enzymes de restriction *NcoI* et *XhoI* (Promega) se font dans un volume final de 100 µL en présence de 1 µg de matrice (insert ou vecteur) et de 10 unités de chaque enzyme dans le tampon de réaction D (Promega). Après 1 heure d'incubation à 37°C, les produits digérés sont purifiés à l'aide du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) et élués par 25 µL d'eau.

e) Déphosphorylation du vecteur

Afin d'empêcher la religature du vecteur digéré sur lui-même et dans le but d'améliorer le rendement de ligature vecteur-insert, après restriction, le vecteur est déphosphorylé en présence de TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega ; la réaction se déroule dans le tampon fourni et selon les recommandations du fournisseur) pendant 30 minutes à

37°C. L'enzyme TSAP est ensuite inactivée de façon irréversible à 60°C pendant 10 minutes, permettant ainsi de procéder directement à l'étape de ligature.

f) Ligature du vecteur d'expression et de l'insert digérés

Le vecteur pET-16b et l'insert TRX z digérés et purifiés sont ligaturés dans un volume final de 10 µL en présence de la ligase du bactériophage T4 (T4 DNA Ligase, Promega) dans un rapport mole à mole insert/vecteur de 5 : 1 en présence de 100 ng de vecteur. La réaction se déroule à température ambiante pendant 1 heure puis à 4°C sur la nuit. Les réactions de ligature sont ensuite placées sur membrane de dessalage (0,025 µm, Millipore) pendant 30 minutes à température ambiante.

g) Transformation de bactéries compétentes par électroporation

i. Préparation des bactéries électrocompétentes

Les bactéries (souche DH5αF') sont cultivées dans 1 L de milieu LB. Lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint 0,5 (phase exponentielle de croissance), la culture est placée dans la glace pendant 15 minutes afin de stopper la croissance. Les cellules sont ensuite lavées successivement dans 1 volume d'eau froide, 0,5 volume d'eau froide et 20 mL de glycérol 10% froid en centrifugeant 10 minutes à 4000 rpm entre chaque lavage. Les cellules sont ensuite reprises dans $1/500^{ème}$ du volume initial de culture dans du glycérol 10% froid puis sont conservées à -80°C.

ii. Électroporation

Les bactéries électrocompétentes sont transformées avec 2 à 5 µL de produit de ligature dessalé, dans une cuvette d'électroporation de 1 mm d'épaisseur (Eurogentec). Après 10 minutes d'incubation sur glace, les bactéries sont soumises à une tension de 1,8 kV (*E. coli* Pulser™ Apparatus, Bio-Rad). Les bactéries sont immédiatement reprises dans 1 mL de milieu LB additionné de 1% de glucose puis incubées à 37°C sous agitation pendant 45 minutes.

Les bactéries transformées sont ensuite sélectionnées en étalant 100 µL et 900 µL de la culture sur milieu LB gélosé supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) puis placées à 37°C pour la nuit.

h) Criblage des transformants par PCR

Cette technique permet de confirmer la présence du plasmide recombinant dans les colonies sélectionnées. Chaque colonie testée est prélevée avec un cône stérile, repiquée sur milieu LB gélosé sélectif (ampicilline 100 µg/mL) et ajoutée au milieu de réaction PCR. Afin d'identifier les colonies qui ont intégré le plasmide, une amorce qui s'hybride sur le vecteur (pETseq-up : CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG) et une amorce qui s'hybride sur l'insert (TRXz-dw, Tableau 1) sont utilisées. La réaction de PCR se fait dans un volume final de 20 µL en présence d'une unité de polymérase GoTaq (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) et du tampon associé, de 5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP et 0,5 µM de chaque amorce. Les colonies positives identifiées sont ensuite mises en culture dans 5 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) et placées en agitation à 37°C pour la nuit.

i) Extraction et purification d'ADN plasmidique bactérien par lyse alcaline

Les plasmides recombinants sont extraits par la méthode de la lyse alcaline, traités à la RNase, précipités au PEG et repris dans 50 à 100 µL de tampon TE (Tris-HCl pH 7,9 10 mM ; EDTA 1 mM) selon la méthode Zhou (Zhou, 1997) (fiche technique en Annexe 3).

j) Séquençage

Le séquençage des construits obtenus est réalisé en prestation externe par Eurofins MWG Operon (https://ecom.mwgdna.com/services/home.tcl?usca_p=t), permettant ainsi de valider le clonage de l'ADNc de TRX z dans le vecteur d'expression pET-16b.

2) Production et purification de la TRX z recombinante

La TRX z a été produite et purifiée selon une modification de la procédure mise au point par Stein et al. (Stein et al., 1995).

a) Transformation de bactéries compétentes par la méthode DMSO

i. Préparation des cellules compétentes par le DMSO

20 à 30 mL de milieu LB stérile sont inoculés au 1/100^{ème} avec une culture bactérienne de nuit (souche BL21 (DE3)) et incubés en agitation à 37°C. Lorsque la DO_{600nm} est comprise entre 0,4 et 0,6, les cellules sont collectées par centrifugation à 4000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le culot de bactéries est ensuite repris par 1/10^{ème} du volume initial de culture dans le tampon « Transformation and Storage Buffer » (TSB) stérile (PEG 4000 10% ; DMSO 5% ; MgSO₄ 10 mM ; MgCl₂ 10 mM dans du milieu LB) et incubé 20 minutes sur glace. Les bactéries, prêtes pour la transformation, sont aliquotées (100 µL) et conservées à -80°C. Le DMSO joue ici un rôle de protection des cellules lors de la congélation.

ii. Transformation des bactéries par choc thermique

Les bactéries compétentes (100 µL) sont transformées avec 10 à 50 ng d'ADN (plasmide d'expression recombinant pET-16b :: TRX z). Après 10 minutes d'incubation sur glace, un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes est réalisé, suivi de 30 minutes d'incubation sur glace. Les bactéries sont ensuite reprises dans 1 mL de milieu LB additionné de 1% de glucose puis incubées à 37°C sous agitation pendant 45 minutes. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu LB gélosé supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) puis placées à 37°C pour la nuit.

b) Production de la protéine recombinante TRX z

La thiorédoxine recombinante est produite sous forme soluble par le système pET-16b/BL21. Trois colonies de bactéries BL21, transformées la veille avec le plasmide recombinant pET-16b :: TRX z (voir section II. A. 2) a) ii)) sont cultivées à 37°C pendant 8 heures dans 3 mL de milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg/mL (pré-cultures). 50 mL de milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg/mL sont ensuite ensemencés par une des pré-cultures et placés à 37°C en agitation pour la nuit. Par la suite, cinq cultures de 800 mL de

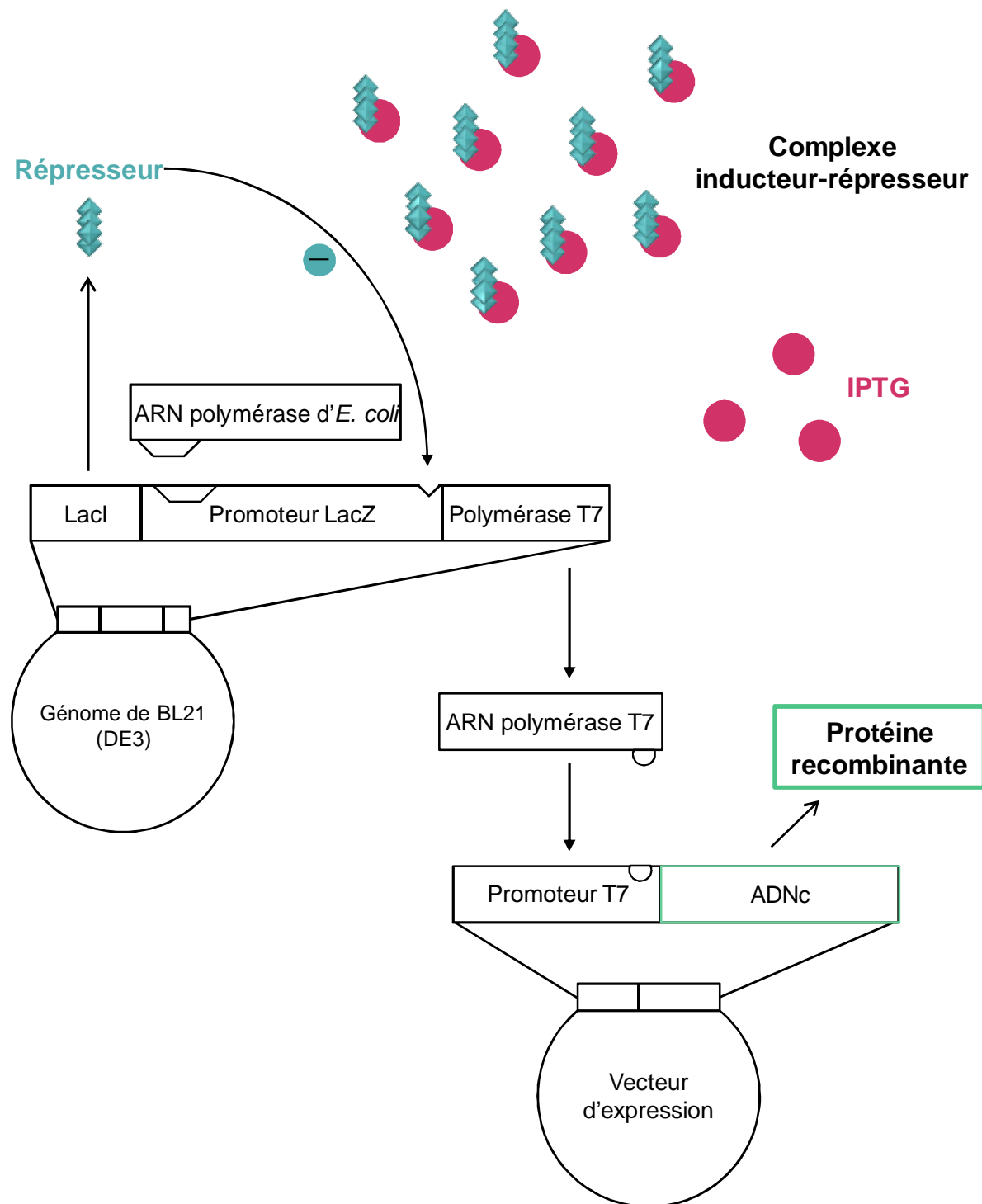


Figure 15 : Système de production des protéines recombinantes dans *E. coli* (BL21 (DE3)).

Le gène *LacI* est constitutivement exprimé ce qui réprime la transcription du gène codant l'ARN polymérase T7. En présence d'IPTG, le produit du gène *LacI* se complexe avec l'analogue du galactose et ne se fixe plus sur le promoteur *LacZ*. L'ARN polymérase T7 est alors produite permettant ainsi la transcription du gène d'intérêt cloné en aval du promoteur $\phi 10$ (d'après Studier et al., 1990).

milieu LB stérile additionné d'ampicilline 100 µg/mL sont chacunensemencées par 8 mL de la culture de nuit et placées à 37°C en agitation jusqu'à ce que la DO_{600nm} soit comprise entre 0,4 et 0,6. La production de TRX z recombinante est alors induite par l'ajout d'IPTG 300 µM (Figure 15) et s'effectue à 30°C sur la nuit. La présence du plasmide dans les bactéries est maintenue par l'ajout d'ampicilline 100 µg/mL.

c) Extraction des protéines solubles totales

Les cellules des 4 litres de culture sont récoltées par centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le culot bactérien est repris et lavé dans le tampon « Tris Salin Buffer » (TSB) froid (Tris-HCl pH 7,9 30 mM ; EDTA 1 mM, NaCl 0,9% (p/v)) puis est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le culot final est ensuite soumis à une période de congélation. Il peut être conservé à -20°C sur la nuit ou être rapidement plongé dans l'azote liquide. Les membranes des bactéries sont ainsi fragilisées, permettant d'augmenter par la suite le rendement d'extraction protéique. Le culot est ensuite repris dans du tampon TE (Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 ; EDTA 1 mM) supplémenté en cocktail d'anti-protéases (*cOmplete EDTA Free Cocktail Tablets*, Roche). Les protéines totales sont extraites par trois passages à la presse de French (10 000 PSI) : la surpression provoque l'éclatement des cellules. Les protéines solubles totales sont récupérées après centrifugation à 18000 rpm pendant 45 minutes à 4°C.

d) Enrichissement de l'extrait en TRX z

i. Traitement thermique

L'extrait de protéines solubles total est enrichi en thiorédoxine recombinante en utilisant leur propriété de thermostabilité. L'extrait est dosé et dilué dans du tampon TE afin d'atteindre une concentration en protéines de 30 mg/mL. L'extrait protéique est alors chauffé à 60°C pendant 5 minutes sous agitation puis placé dans la glace pendant 10 minutes. Les protéines thermosensibles insolubilisées sont séparées des protéines thermostables solubles par centrifugation à 18000 rpm pendant 45 minutes à 4°C.

ii. Traitement au sulfate d'ammonium

Cette seconde étape d'enrichissement permet de séparer les protéines en fonction de leur solubilité, qui varie selon leur composition. Le sulfate d'ammonium entre en compétition

avec les protéines pour l'accès aux molécules d'eau, sans les dénaturer. L'extrait de protéines solubles thermostables est ainsi traité à différentes concentrations en sulfate d'ammonium (20% ; 40% ; 80% ou 95%). Après centrifugation à 18000 rpm pendant 30 minutes à 4°C, le culot de protéines précipitées est repris dans du TE et dialysé contre 250 volumes de TE à 4°C sur la nuit. L'extrait est ensuite centrifugé à 18000 rpm pendant 20 minutes à 4°C pour éliminer les protéines précipitées au cours de la dialyse qui risqueraient de compromettre les étapes de purification suivantes.

e) Purification de la protéine recombinante TRX z

i. Chromatographie d'exclusion (tamis moléculaire)

Cette première étape consiste à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. La résine Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) fractionne les protéines d'une masse moléculaire inférieure à 30 kDa. Les protéines de masse moléculaire élevée passent entre les billes de Sépharose tandis que les protéines de faible masse moléculaire passent à l'intérieur de ces billes et sont d'autant plus ralenties qu'elles sont petites. La colonne (62 cm x 5 cm) est équilibrée avec 2 L de tampon TE, NaCl 0,2 M. L'extrait protéique issu du traitement au sulfate d'ammonium est chargé sur la colonne de résine et l'élution des protéines se fait dans le tampon utilisé pour l'équilibration. L'élution des protéines est suivie à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV relié à un enregistreur. L'extrait de protéines récoltées est ensuite concentré sur une cellule de concentration équipée d'une membrane qui permet de retenir les molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa (cellule de concentration Amicon, membrane YM10, seuil de rétention > 10 kDa) et dialysé contre 250 volumes de TE sur la nuit à 4°C.

ii. Chromatographies échangeuse d'anions

La chromatographie échangeuse d'anions consiste à séparer les protéines en fonction de leur charge globale de surface. La résine de diéthylaminoéthyle-Sepharcel (DEAE) est une résine échangeuse d'anions. Les molécules dont la charge globale de surface est négative vont être accrochées sur la colonne *via* des liaisons électrostatiques formées avec les groupements amines greffés sur les billes de cellulose. L'élution des protéines se fait donc ensuite par un gradient de NaCl. Lors de ce gradient, les ions de la solution saline vont entrer en compétition avec les charges de surface des protéines qui vont alors se décrocher de la

résine. Les acides nucléiques, retenus par la résine par les résidus phosphate, sont également éliminés lors de cette étape et sont élués à des concentrations en sel de l'ordre du molaire.

L'extrait protéique récolté après l'étape de tamis moléculaire est chargé sur la colonne de résine DEAE (Amersham Biosciences, 13,5 cm x 33 cm) préalablement équilibrée avec 1 L de TE. Lorsque les protéines sont chargées sur la colonne, la résine est lavée par 100 mL de TE puis classiquement élue par un gradient de NaCl 0 à 0,4 M (250 mL/250 mL). L'élution des protéines est suivie à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV relié à un enregistreur. L'extrait de protéines récoltées est ensuite concentré et dialysé contre 250 volumes de TE sur la nuit à 4°C.

Afin d'obtenir une préparation de TRX z homogène et pure, une étape supplémentaire de chromatographie sur colonne échangeuse d'anions, de type mono-Q HR 5/5 HPLC (Amersham Biosciences) est réalisée. Cette étape de chromatographie est plus résolutive et permet ainsi de mieux séparer la TRX z des autres protéines. Les protéines, préalablement traitées au DTT_{red} 20 mM, afin de réduire d'éventuels ponts disulfure, sont éluées par un gradient en NaCl de 0 à 1 M dans du tampon Tris-HCl pH 7,9 30 mM. Comme précédemment, les fractions récoltées sont concentrées et dialysées contre 250 volumes de TE sur la nuit à 4°C.

B. Clonage, production et purification de la TRX z étiquetée (*Strep*-tag)

Il s'agit ici de cloner, produire et purifier la forme maturée (dépourvue du peptide d'adressage au chloroplaste, Lys79) de TRX z fusionnée à une étiquette *Strep*-tag II dans le vecteur d'expression pGENI (section I. A. 1) c)). L'utilisation du *Strep*-tag présente de nombreux avantages : tout d'abord, la purification d'une protéine recombinante fusionnée au *Strep*-tag se fait en une unique étape (Schmidt and Skerra, 2007). De plus, un anticorps commercial dirigé spécifiquement contre le *Strep*-tag (IBA) est disponible.

Nom	Séquences 5' → 3'	Sites de restriction
TRXz-up (sens)	AAACCATGGCAAAATTGTCAGCTCAAGAACTTCAGG	<i>NcoI</i>
TRXz-dw2 (reverse)	TTTCTCGAGCATCTCGTTGTCAATGATATCGTGCATCATCTGTAACG	<i>XhoI</i>

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage pGENI :: TRX z.

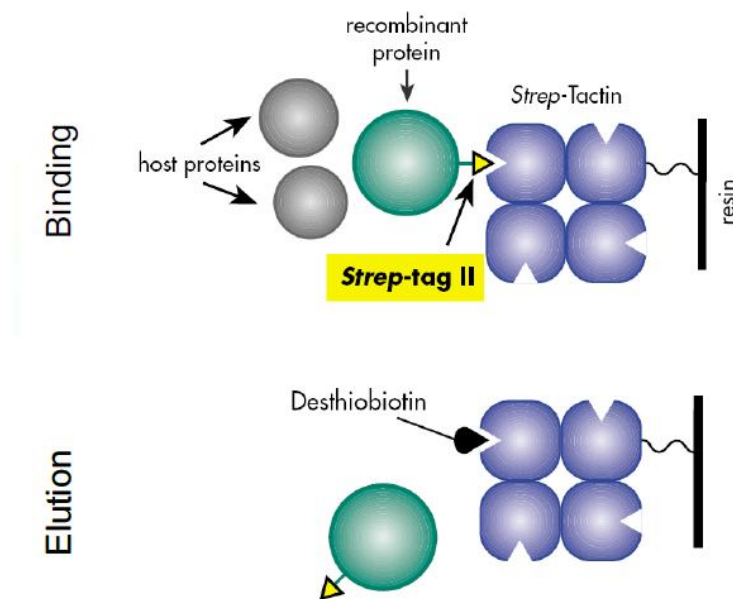


Figure 16 : Principe de purification d'une protéine recombinante fusionnée au Strep-tag II.

La queue de 8 acides aminés (Strep-tag II) fusionnée en position C-terminale de la protéine recombinante TRX z permet la liaison de celle-ci à la résine Strep-Tactin. Après lavage, la protéine étiquetée peut être éluée par l'ajout de desthioiotine, fort compétiteur du Strep-tag II vis-à-vis de la résine.

1) Clonage

Les étapes de clonage sont les mêmes que celles précédemment décrites (voir section II. A. 1)). Cependant, lors de l'amplification de l'ADNc de TRX z, les oligonucléotides utilisés ont été modifiés (Tableau 2), permettant ainsi le clonage de l'ADNc de TRX z dans le vecteur d'expression pGENI en phase avec l'étiquette *Strep*-tag II (voir Figure 12 B).

2) Production et purification de la TRX z recombinante étiquetée

Les étapes de production de la protéine recombinante et d'extraction des protéines solubles totales sont identiques à celles précédemment décrites (section II. A. 2) b) et c)).

La purification de la protéine recombinante est facilitée par la présence de l'étiquette *Strep*-tag II en position C-terminale de la protéine. En effet, cette étiquette mime la structure de la biotine qui présente une très haute affinité pour la streptavidine. La purification de la protéine recombinante se fait ainsi en une seule étape de chromatographie sur colonne d'affinité streptavidine (*Strep*-Tactin® Sepharose, IBA). L'extrait de protéines solubles totales est chargé sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon W (Tris-HCl pH 8 100 mM ; EDTA 1 mM ; NaCl 150 mM). La résine est ensuite lavée par 15 mL de tampon W puis la protéine d'intérêt est éluée par 10 mL de tampon W contenant 2,5 mM de desthiobiotine (Sigma). Il se crée une compétition entre l'étiquette *Strep*-tag II et la desthiobiotine, présente en excès, vis-à-vis de la streptavidine, permettant ainsi l'élution de la protéine recombinante (Figure 16).

L'éluat protéique est ensuite concentré (cellule de concentration Amicon, membrane YM10). La dialyse de l'éluat se fait au même moment par l'ajout de tampon TE dans le milieu (étapes de dilution/concentration successives).

C. Production et purification des protéines recombinantes

NTRC et MSRB2, étiquetées polyHis

1) Production des protéines recombinantes

Le vecteur d'expression permettant la production et la purification de la protéine recombinante NTRC et les culots bactériens de production de la protéine MSRB2 nous ont été généreusement fournis par Jean-Philippe Reichheld (Université de Perpignan) et Pascal Rey (CEA, Cadarache) respectivement.

Production de la protéine recombinante NTRC

La souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3), transformée au préalable avec le plasmide d'expression pET-16b :: NTRC, est cultivée à 37°C en milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL). Lorsque la DO_{600nm} est comprise entre 0,4 et 0,6, la production de la protéine recombinante est induite par l'ajout de dIPTG 500 µM puis est poursuivie sur la nuit à 30°C.

2) Purification des protéines recombinantes

a) Purification de la protéine recombinante NTRC

La culture bactérienne de nuit est centrifugée à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot de bactéries est remis en suspension dans le tampon d'extraction (Tris-HCl 30 mM, pH 7,9) supplémenté en cocktail d'anti-protéases (*cOmplete EDTA Free Cocktail Tablets*, Roche). Les protéines solubles sont extraites par trois passages à la presse de French (10 000 P.S.I.). Les protéines solubles sont récoltées par centrifugation à 18 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C.

La purification de la protéine se fait en une seule étape sur une colonne de Nickel (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma). Il est important de ne pas ajouter d'EDTA aux tampons utilisés lors de la purification, l'EDTA étant un chélateur d'ions. La colonne de purification (2 mL de résine) est équilibrée au préalable avec 50 mL de tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9. L'extrait protéique est passé deux fois sur la colonne puis celle-ci est lavée dans un premier temps avec 40 mL de tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 puis avec 50 mL de tampon Tris-HCl

contenant 20 mM d'imidazole. L'élution de la protéine, suivie à 280 nm, se fait avec du tampon Tris-HCl contenant 200 mM d'imidazole. Après concentration (cellule de concentration Amicon, membrane YM30 (seuil de rétention >30 kDa)), la protéine est dialysée contre du tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 sur la nuit à 4°C.

b) Purification de la protéine recombinante MSRB2

Le culot de bactéries est remis en suspension dans le tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, pH 7,9 ; NaCl 500 mM; imidazole 25 mM; phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 1 mM) puis les protéines solubles sont extraites par trois passages à la presse de French (10 000 P.S.I.). Après centrifugation à 18 000 rpm pendant 45 minutes à 4°C, l'extrait de protéines solubles totales est purifié sur colonne de Nickel. La colonne est pré-équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, NaCl 500 mM puis lavée avec 25 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, NaCl 500 mM et imidazole 25 mM. Lorsque l'extrait de protéines est chargé, la colonne est lavée puis les protéines sont éluées par 20 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, NaCl 500 mM additionné enimidazole 200 mM. La préparation de protéine purifiée est ensuite dessalée (élimination de l'imidazole) puis concentrée (cellule de concentration Amicon, membrane YM10).

D. Techniques générales pour l'analyse des protéines

1) Dosages des protéines

Les concentrations des extraits sont déterminées spectrophotométriquement par la méthode BCA (Sigma) pour les mélanges de protéines et par l'absorbance à 280 nm et le coefficient d'extinction molaire ϵ_m pour les solutions de protéines purifiées.

a) Dosage BCA

Cette méthode est basée sur la réduction du cuivre par les liaisons peptidiques ainsi que par certains acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) à pH alcalin. Les ions cuivreux (Cu^+) générés forment un complexe de couleur pourpre avec deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA). Ce complexe absorbe à 562 nm. Le dosage des protéines d'un extrait

Coefficients d'extinction molaire (M ⁻¹ . cm ⁻¹)	
TRX z	10 160
NTRC	40 550
MSRB2	26 930

Tableau 3 : Coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes TRX z, NTRC et MSRB2.

de concentration inconnue est comparé aux valeurs obtenues avec celles d'une gamme étalon réalisée avec la protéine albumine sérum bovin (BSA).

Le dosage des protéines se fait dans un volume final de 50 μL contenant 2 à 5 μL d'extrait protéique. Le réactif (980 μL de solution BCA, 20 μL de solution CuSO_4 4%) est ensuite ajouté et le tout est chauffé à 50°C pendant 10 minutes. Après incubation sur glace, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 562 nm.

b) Absorbance à 280 nm

Ce dosage est basé sur l'absorbance des acides aminés aromatiques à 280 nm dont les coefficients d'extinction molaire ϵ_m (en M^{-1}) sont de 5600 pour le Tryptophane (W), 1400 pour la Tyrosine (Y) et 90 pour la Phenylalanine (F). Les coefficients d'extinction molaires des protéines purifiées au cours de cette étude sont indiqués dans le Tableau 3.

2) Electrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE)

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, en présence de SDS et de glycérol (Laemmli, 1970; Schagger and von Jagow, 1987). La composition des gels et des solutions est détaillée en annexe 2. Dans les cas de la TRX z, les conditions d'électrophorèse sont non réductrices (détection de ponts disulfure par « redox Western blot ») ; le bleu de dissociation ne contient pas de β -mercaptoéthanol (annexe 2). Les protéines dénaturées sont chargées négativement (action du SDS) et ne vont ainsi être séparées qu'en fonction de leur masse moléculaire. Lors de la migration, l'utilisation d'un marqueur de masse moléculaire (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen ; annexe 2) permet d'identifier la masse de la protéine d'intérêt. Lorsque la migration est terminée (tension de 100 V), les protéines peuvent être révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane (immunodétection par Western blot).

3) Coloration des protéines au bleu de Coomassie

La composition des solutions utilisées pour la coloration des protéines au bleu de Coomassie est donnée en annexe 2. Lorsque la migration est terminée, le gel est incubé 30 minutes dans la solution de coloration puis est transféré et incubé dans la solution de décoloration.

4) Transfert des protéines sur membrane

Après migration du gel, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (iBlot Transfer Stack Nitrocellulose, Invitrogen) pendant 6 minutes sous une tension constante de 23 V dans un appareil d'électrotransfert à sec (iBlot Dry Blotting System, Invitrogen).

5) Western blot

Le Western blot permet la détection de protéines d'intérêt sur une membrane grâce à un système d'anticorps couplé à une peroxydase. Dans le cas de la détection de la protéine recombinante TRX z, deux anticorps ont pu être utilisés : un anticorps commercial dirigé contre le *Strep*-tag II (1) ou un anticorps de lapin dirigé spécifiquement contre la TRX z (2). L'anticorps dirigé contre la TRX z a été obtenu à partir d'un mélange de deux peptides spécifiques de la TRX z (peptide 1 : SPDPSKDAIRTEGLIC ; peptide 2 : SAQELQELVKGDRKVC).

Après transfert, la membrane est saturée dans du tampon « Phosphate Buffer Saline » (PBS) (KH_2PO_4 1,5 mM ; Na_2HPO_4 7,9 mM ; KCl 2,7 mM ; NaCl 137 mM, pH 7,5) contenant 4% de BSA (p/v) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite exposée : (1) à l'anticorps commercial dirigé contre le *Strep*-tag II, couplé à une peroxydase de raifort (StrepMAB-Classic horseradish peroxidase (HRP) conjugate, IBA), à une dilution de $1/10000^{\text{ème}}$ ou (2) à l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la TRX z (Génosphère Biotechnologies) à une dilution de $1/500^{\text{ème}}$ dans du PBS additionné de 0,1% de Tween 20 (PBST) sur la nuit à 4°C puis, après lavage de la membrane, à un anticorps secondaire d'ânesse anti IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort (Amersham) à une dilution de $1/50000^{\text{ème}}$ pendant 1 heure.

Dans les deux cas, la présence de la peroxydase permet de détecter le complexe formé par une réaction chimique du kit ECL⁺ (Amersham Biosciences). En présence de peroxyde, la peroxydase oxyde un dérivé du diacylhydrazide, le Lumigène PS-3, en acridinium ester. Ce dernier réagit avec les peroxydes à pH alcalin, aboutissant à la formation d'un composé chimioluminescent dont le maximum d'émission est à une longueur d'onde de 430 nm. La membrane est ensuite exposée à un film photographique qui est impressionné par la lumière émise par le composé chimioluminescent.

E. Tests *in vitro* de l'activité oxydoréductase de la TRX z

1) Test de réduction de l'insuline (test turbidimétrique)

La réduction de l'insuline par la TRX z est testée selon la méthode décrite par Holmgren (Holmgren, 1979) : la réduction du pont disulfure entre les chaînes α et β de l'insuline induit la précipitation des chaînes β libres ce qui augmente ainsi la turbidité de la solution. La réduction de l'insuline peut ainsi être suivie spectrophotométriquement à 650 nm.

L'insuline de pancréas de bœuf (Sigma) est reprise dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8 puis est solubilisée à pH acide (2-3) par ajout d'acide chlorhydrique (HCl). Le pH de la solution est ensuite rapidement ajusté à pH 8 en présence de soude (NaOH). La mesure de réduction de l'insuline par la TRX z est réalisée à 30°C dans 1 mL de milieu de réaction contenant : Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 2 mM, insuline 0,13 mM et une concentration en TRX variable (0 à 10 μ M). La réaction est déclenchée par l'ajout de DTT 1 mM. La variation d'absorbance à 650 nm est ensuite mesurée pendant 50 minutes.

2) Test d'activation de la MDH à NADP

La malate déshydrogénase (MDH) à NADP est une des enzymes cibles des thiorédoxines de type f et m (Buchanan et al., 1978; Jacquot et al., 1978). Cette enzyme catalyse la réduction de l'oxaloacétate (OAA) en malate en oxydant son cofacteur, le NADPH. La consommation du NADPH au cours de la réaction peut être suivie au spectrophotomètre à

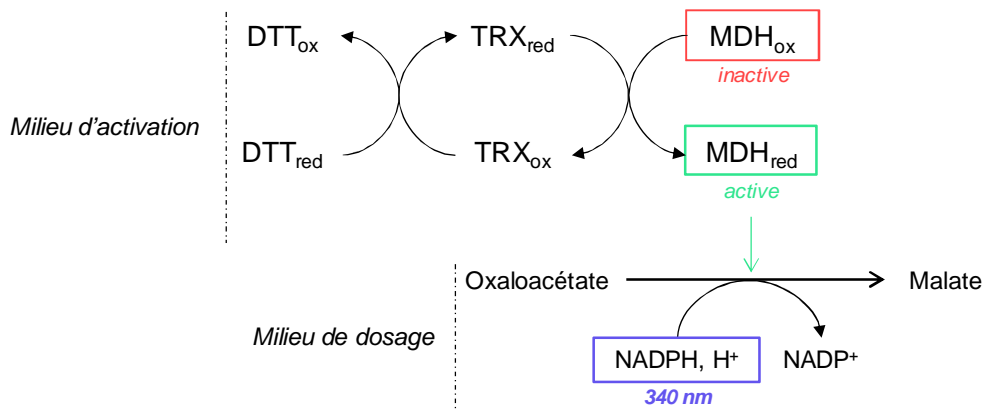


Figure 17 : Principe de la mesure d'activation de la MDH à NADP par les thiorédoxines.

Dans le milieu d'activation, la thiorédoxine recombinante est réduite par le DTT qui peut alors activer par réduction la MDH à NADP. Dans le milieu de mesure d'activité, la disparition de l'OAA dépendante du NADPH est mesurée à 340 nm (Jacquot et al., 1976).

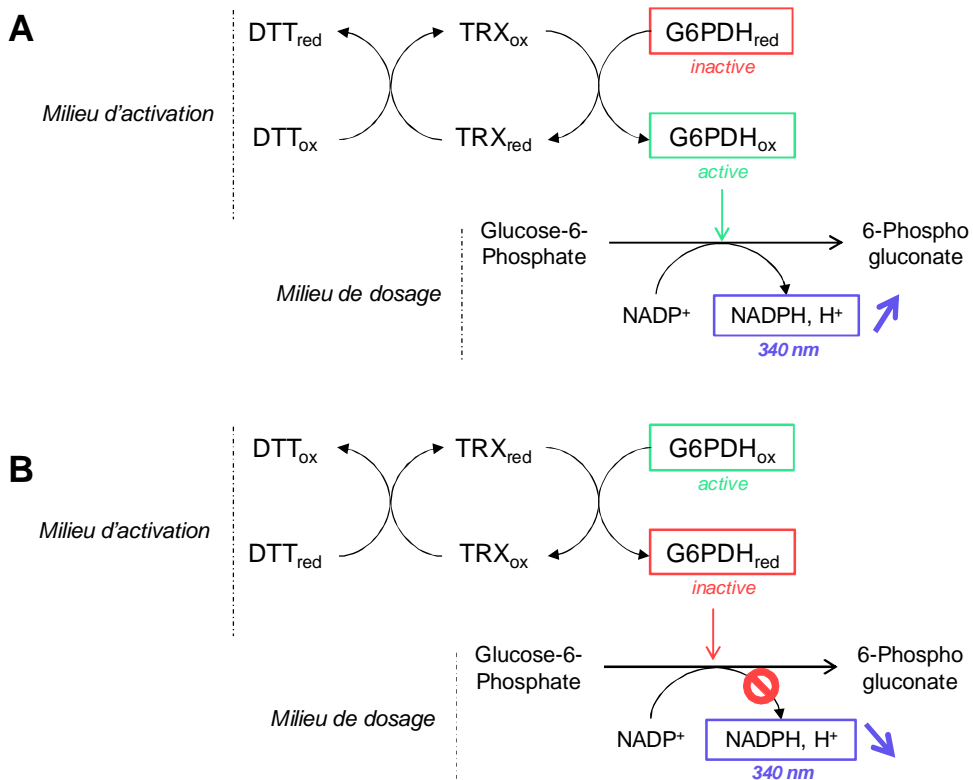


Figure 18 : Principe de la mesure d'activation par oxydation (A) et d'inhibition par réduction (B) de la G6PDH par les thiorédoxines.

A, dans le milieu d'activation, la thiorédoxine est oxydée par le DTT_{ox} et peut alors activer par oxydation la G6PDH réduite. L'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate dépendante du NADP⁺ est alors suivie à 340 nm par l'apparition du NADPH ; B, Dans le milieu d'activation, la thiorédoxine, réduite par le DTT_{red}, va réduire la G6PDH oxydée et l'inhiber. L'apparition du NADPH au cours du temps va ainsi diminuer selon l'inhibition d'activité de la G6PDH.

340 nm et reflète directement l'activation de l'enzyme. Deux versions de la MDH à NADP de sorgho ont été utilisées :

(1) la MDH à NADP recombinante $\Delta 15$, une forme raccourcie de ses 15 premiers acides aminés (ce qui ne modifie pas ses propriétés biochimiques) (Johansson et al., 1999) ;

(2) la MDH à NADP recombinante 207/2C, une version mutée qui ne possède plus le pont régulateur C-terminal et qui, par conséquent, est plus facile à activer que la forme $\Delta 15$ (Ruelland et al., 1997).

La mesure de l'activité thiorédoxine se fait en deux étapes. Dans un premier temps, la MDH à NADP (5 μ M) est activée en présence de thiorédoxine et de DTT (10 à 100 mM) dans le tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8 à 25°C. L'activité de la MDH à NADP se mesure ensuite à 30°C en suivant la consommation du NADPH dans le milieu réactionnel (OAA 750 μ M ; NADPH 180 μ M dans le tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,9) à 340 nm (Figure 17).

3) Test d'activité de la G6PDH

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est une enzyme clé du cycle oxydatif des pentoses phosphate (OPPP) qui peut être inhibée par réduction et activée par oxydation par les thiorédoxines plastidiales (Née et al., 2009). Dans le but de valider l'activité oxydoréductase de la TRX z recombinante, l'activation et la réduction de la G6PDH en présence de TRX z ont été testées.

La G6PDH catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconate en présence de NADP^+ , qui est alors réduit en NADPH, H^+ (Figure 18). L'activation de la G6PDH peut ainsi être mesurée en suivant l'apparition du NADPH à 340 nm. La mesure d'activité de la G6PDH se fait à 30°C dans le milieu de dosage contenant : G6P 2 mM et NADP 200 μ M dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,9. Il est à noter que le G6P, une fois dissous dans l'eau, est très acide ; le pH de la solution mère de G6P (200 mM) est donc ajusté au préalable à pH neutre avec du NaOH 10N.

Les mesures d'activation de la G6PDH par oxydation se font en présence d'un oxydant chimique (DTT_{ox} 10 mM), de 0,2 μ M d'enzyme pré-réduite et de 10 μ M de thiorédoxine (Figure 18 A) ; les mesures d'inhibition de la G6PDH par réduction se font en présence d'un

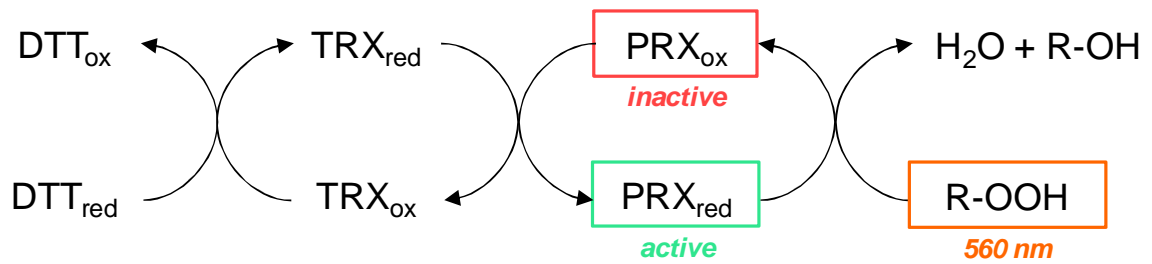


Figure 19 : Principe de la mesure d'activité de la 2-Cys PRX par les thiorédoxines.

Dans le milieu réactionnel, le DTT_{red} va réduire la thiorédoxine qui pourra servir de substrat réducteur à la 2-Cys PRX et ainsi l'activer. La 2-Cys PRX va ensuite réduire son substrat (R-OOH , ici l' H_2O_2). Dans le milieu de dosage, l' H_2O_2 résiduel va oxyder les ions ferreux (Fe^{2+}) en ions ferriques (Fe^{3+}) qui vont former, avec le xylénol orange, un complexe coloré qui peut être mesuré à 560 nm.

réducteur fort (DTT_{red} 1 mM), de 0,2 µM d'enzyme pré-oxydée et de 1 µM de thiorédoxine (Figure 18 B). L'activation/l'inhibition de la G6PDH sont suivies spectrophotométriquement à 340 nm en suivant l'apparition/la disparition de NADPH au cours du temps.

4) Test d'activation de la 2-Cys PRX

La 2-Cys PRX A plastidiale d'*Arabidopsis thaliana* est une peroxydase thiorédoxine dépendante qui réduit les hydroperoxydes d'alkyles (Figure 19). Son activité est mesurée au spectrophotomètre par la disparition de son substrat, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans le milieu réactionnel contenant 20 µM de protéine recombinante 2-Cys PRX A d'*Arabidopsis*, 400 µM de DTT_{red}, 600 µM de H₂O₂ et 10 µM de thiorédoxine recombinante dans du tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9. Le substrat H₂O₂ restant dans le milieu réactionnel est dosé, après 15 minutes d'incubation à température ambiante, à 560 nm avec 1 mL du réactif xylénol orange 125 µM dilué dans du sorbitol 100 mM, H₂SO₄ 25 mM, Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂ 250 µM. La quantité d'H₂O₂ résiduelle est calculée en comparant la valeur d'absorbance à 560 nm obtenue avec celles mesurées sur une gamme étalon d'H₂O₂ allant de 0 à 1 mM.

Dans le milieu réactionnel, la PRX utilise la thiorédoxine et le peroxyde d'hydrogène (R-OOH) comme substrat pour former de l'eau. Dans le milieu de dosage, le peroxyde résiduel oxyde les ions ferreux (Fe²⁺) en ions ferriques (Fe³⁺) qui vont former, avec le xylénol orange, un complexe stable et coloré qui peut être mesuré à 560 nm.

F. Recherche du système de réduction de la TRX z

1) Mise en évidence de la réduction de la TRX z par traitement chimique et marquage radioactif des groupements thiols

Dans un premier temps, la réduction de la TRX z recombinante par traitement chimique a été testée. La TRX z (10 µM) a été traitée par un oxydant, le trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane (DTT_{ox}, 10 mM) ou par un réducteur puissant, le dithiothréitol (DTT_{red}, gamme de 1 à 100 mM) pendant 15 minutes à température ambiante. La réduction de la TRX z a ensuite été

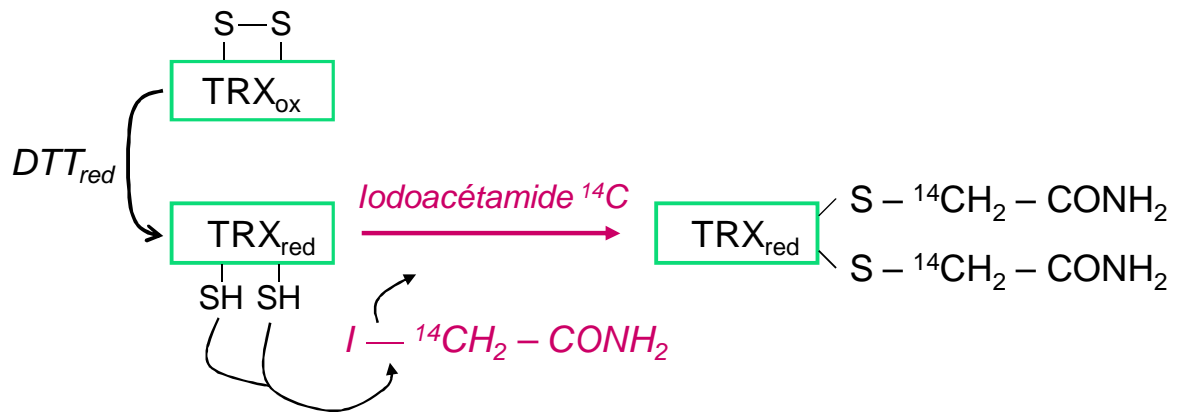


Figure 20 : Principe de l'alkylation des groupements thiols libres par l'iodoacétamide radiomarké (^{14}C -IAM).

L'iodoacétamide est un alkylant des thiols qui se fixe de façon covalente aux groupements thiols réduits ($-\text{SH}$) de la protéine.

analysée par électrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE) et par Western blot.

Le statut redox de la TRX z a été analysé par alkylation des groupements thiols libres (-SH) à l'iodoacétamide (IAM) marqué au carbone 14 ($[^{14}\text{C}]\text{IAM}$), dont le principe est résumé en Figure 20.

Ainsi, 60 μg de TRX z (i) non traités, (ii) traités 15 minutes à température ambiante au DTT_{ox} 10 mM, ou (iii) traités 15 minutes à température ambiante au DTT_{red} 100 mM, sont alkylés en présence d'iodoacétamide 2 mM radiomarké ($[^{14}\text{C}]\text{IAM}$, 0,5 MBeq/ μmol , Amersham). Après précipitation au TCA, 1/10^{ème} de l'échantillon initial est séparé par SDS-PAGE en conditions non réductrices (Droux et al., 1987a). Les protéines sont ensuite colorées au bleu de Coomassie et le marquage des groupements thiols libres (-SH) est visualisé après exposition du gel déshydraté sur un écran de faible énergie pendant 2 semaines.

2) Test de réduction de la TRX z par la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR)

La réduction de la TRX z par le système FTR a été testée *in vitro* en utilisant un système lumière reconstitué regroupant, sous forme de protéines recombinantes, tous les acteurs de ce processus et des thylacoïdes de pois fraîchement préparés.

a) Préparation de thylacoïdes de Pois

Dans un premier temps, 20 grammes de feuilles de Pois de 3 semaines sont broyées dans du tampon MES 50 mM, pH 6,5 ; sorbitol 0,3 M, MgCl_2 1 mM. Le broyat est filtré sur membrane Blutex (nylon 50 μm ; Droux et al., 1987b) puis les chloroplastes sont isolés par centrifugation à 4000 rpm pendant 1 minute à 4°C et lavés dans du tampon HEPES 50 mM, pH 7,5 ; sorbitol 0,3 M ; MgCl_2 1 mM. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 1 minute à 4°C, les thylacoïdes sont obtenus par lyse des chloroplastes dans du tampon HEPES 50 mM, pH 7,5 ; MgCl_2 5 mM et centrifugation à 4000 rpm pendant 1 minute à 4°C. Le culot de thylacoïdes est ensuite lavé dans du tampon HEPES 50 mM, pH 7,5 ; EDTA 0,5 M ; NaCl 5 mM et centrifugé à 4000 rpm pendant 7 minutes à 4°C. Le culot final est remis en suspension

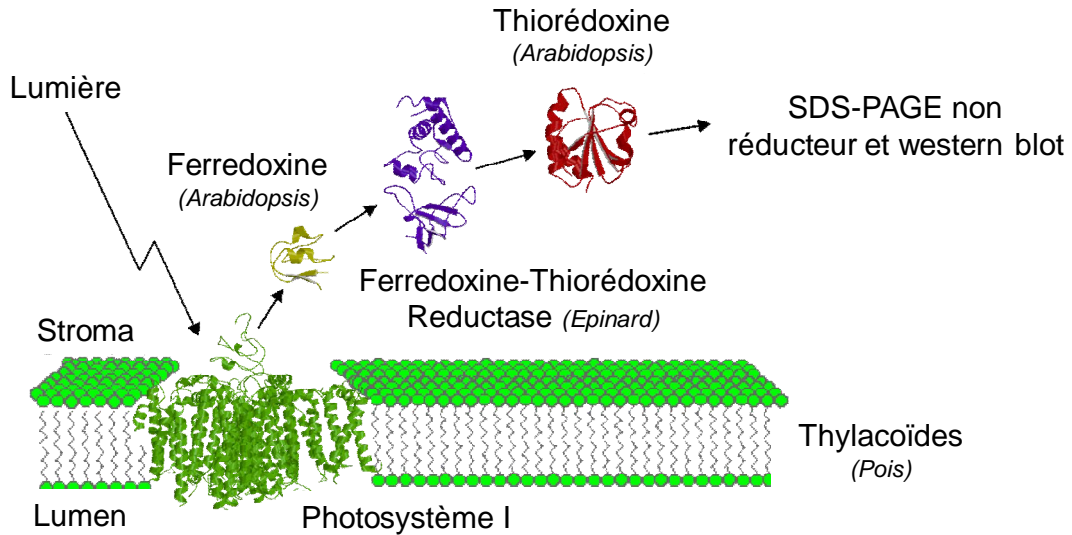


Figure 21 : Système Fd/FTR reconstitué.

La réduction de la TRX est mesurée dans un système lumière reconstitué. A la lumière, les thylacoïdes illuminés vont transmettre les électrons à la Fd qui va alors réduire la FTR. Celle-ci peut alors réduire la TRX. La réduction de la TRX est ensuite suivie sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices et Western blot.

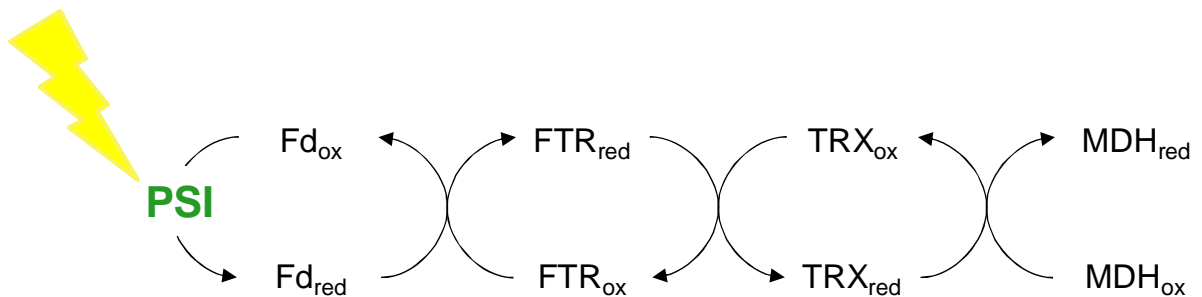


Figure 22 : Principe du suivi de la réduction de la TRX f1 dans le système lumière reconstitué via la mesure d'activation par réduction de la MDH à NADP.

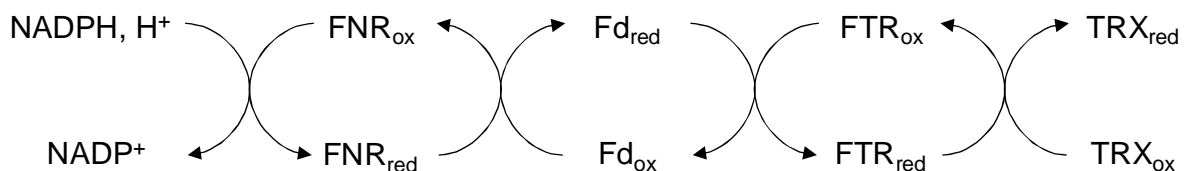


Figure 23 : Système Fd/FTR inversé.

La réduction de la TRX est mesurée dans un système inversé. Ici, la Fd est réduite par la FNR de manière dépendante du NADPH. La Fd réduite va ainsi réduire la FTR qui pourra alors réduire la TRX.

dans du tampon HEPES 50 mM, pH 7,5 ; MgCl_2 5 mM. La quantité de thylacoïdes est estimée par dosage à 652 nm de la chlorophylle extraite dans l'acétone 80% selon l'équivalence: $\text{DO}_{652\text{nm}}/34,5 \rightarrow$ quantité de chlorophylle en mg/mL.

b) Test de réduction de la TRX z dans le système lumière reconstitué

Le système lumière reconstitué (Figure 21) comprend, dans un volume final de 50 μL : les thylacoïdes fraîchement préparés (équivalent à 10 à 20 μg de chlorophylle), du Tris-HCl 100 mM, pH 7,9 ; 2 μM de Fd d'Arabidopsis; 10 μM de FTR d'épinard et 10 μM de TRX z ou de TRX f1. La réaction est initiée en plaçant le mélange réactionnel à 25°C sous une intensité lumineuse de 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. La fonctionnalité du système est vérifiée au préalable en testant l'activation de la MDH à NADP par la TRX f1 réduite dans le système lumière (Figure 22). Des échantillons du mélange réactionnel (contenant la MDH à NADP) sont prélevés à différents temps de réaction et l'activation de l'enzyme par réduction est suivie comme décrit précédemment (section II. E. 2)).

Pour la réduction de la TRX z, des échantillons du milieu réactionnel sont prélevés à différents temps de réaction et les groupements thiols libres sont immédiatement alkylés pendant 30 minutes à l'obscurité à température ambiante en présence de N-éthyl maléimide (NEM) 25 mM et d'acide iodoacétique (IAA) 30 mM. L'état de réduction de la TRX z dans le système lumière est ensuite suivi par électrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (Figure 21).

c) Test de réduction de la TRX z dans le système FTR inversé

Afin de compléter cette approche, une approche *in vitro* utilisant un système inversé a été suivie (Figure 23). Ainsi, 10 μM de TRX z ont été incubés 15 minutes à température ambiante en présence de 20 μM de NADPH, 40 nM de FNR d'épinard, 1 μM de Fd et 1 μM de FTR (Chibani et al., 2011). La réduction de la TRX z est ensuite suivie sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices et Western blot.

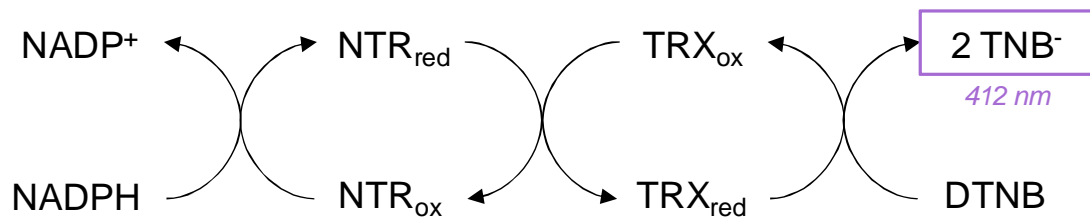


Figure 24 : Principe de la mesure de la réduction des thiorédoxines par la NTRA et la NTRC.
 Dans le mélange réactionnel, la TRX réduite par la NTRA ou la NTRC réduit le DTNB en ions TNB^- dont la production est suivie par spectrophotométrie à 412 nm .

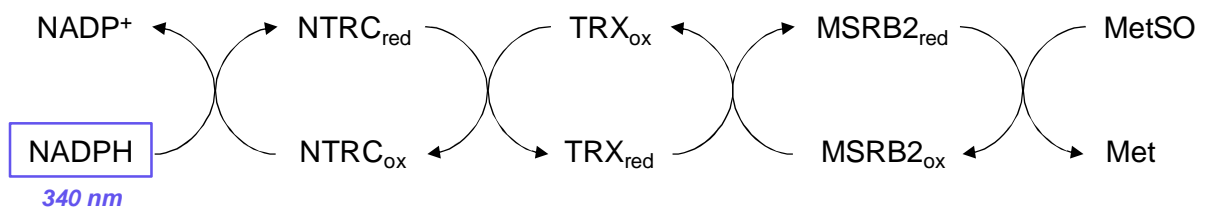


Figure 25 : Principe de mesure de la réduction de la TRX z par la NTRC en utilisant la MSRB2 comme accepteur final d'électrons.

Dans le milieu réactionnel, le NADPH est utilisée par la NTRC pour permettre la réduction de la TRX z. A son tour, cette dernière va réduire la MSRB2 qui pourra alors utiliser son substrat, le MetSO. Ainsi, la réduction de la TRX z par la NTRC est suivie spectrophotométriquement à 340 nm via la disparition du NADPH.

3) Test de réduction de la TRX z par les NADPH-thiorédoxine réductases cytosolique et plastidiale (NTRA et NTRC)

a) Par spectrophotométrie *via* la réduction du DTNB

La capacité de la NTRA et de la NTRC à réduire les thiorédoxines est mesurée par la réduction du 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) (DTNB, Pierce) (Figure 24). La réaction est déclenchée par l'ajout de 10 μM de TRX dans le milieu de mesure (NADPH 150 μM ; 20 nM NTRA ou NTRC ; DTNB 1 mM ; EDTA 1 mM ; NaPO_4 100 mM, pH 8). L'augmentation de l'absorbance à 412 nm due à la réduction du DTNB en thionitrobenzoate (TNB^-) est suivie au spectrophotomètre. Les vitesses initiales sont calculées en μM de DNTB réduit par minute selon la relation $V_0 = \Delta A_{412} / 0,0136$.

b) Par spectrophotométrie *via* la réduction de la MSRB2

Chibani et al.(2011) ont mis en évidence que la TRX z de peuplier est capable de réduire la protéine MSRB2. La réduction de la TRX z par la NTRC a été suivie spectrophotométriquement à 340 nm en utilisant la MSRB2 comme accepteur final d'électrons (Figure 25). La TRX z (50 μM) a été incubée en présence de NADPH 200 μM , de MSRB2 5 μM , du substrat de la MSRB2, le N-acetyl-MetSO (100 mM) et de concentrations variables en NTRC (20 nM, 100 nM, 200 nM et 2 μM) dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,9. La disparition du NADPH à 340 nm est suivie.

c) Par analyse sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices

Dans un premier temps, la TRX z est pré-oxydée en présence de DTT_{ox} 10 mM pendant 20 minutes à température ambiante. Le DTT_{ox} est éliminé sur une colonne Sephadex (PD Spin Trap G-25 column, GE Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, 10 μM de TRX z sont incubés en présence de NADPH 500 μM et/ou 0,2 μM , 2 μM ou 20 μM de NTRC pendant 20 minutes à température ambiante. Les protéines sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices et révélées par Western blot.

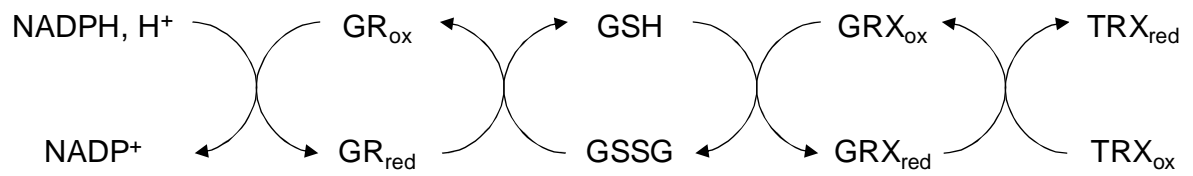


Figure 26 : Système de réduction GSH/GRX.

La forme réduite du glutathion (GSH), générée à partir de glutathion oxydé (GSSG) via l'action de la glutathion réductase (GR), réduit la glutarédoxine (GRX) qui peut alors réduire la thiorédoxine oxydée.

4) Test de réduction de la TRX z par le système GSH/GRX

Dans la recherche du système de réduction de la TRX z, nous avons testé la capacité du système glutathion (GSH)/ glutarédoxine (GRX) à réduire la TRX z *in vitro*, par analogie à ce qui a été démontré pour certaines thiorédoxines cytosoliques qui ne peuvent pas être réduites par le système NTR *in vitro* (Gelhaye et al., 2003) (Figure 26). Pour ce faire, 10 μ M de TRX z pré-oxydée sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante : (i) en présence de glutathion réduit (GSH ; 1, 5 ou 10 mM) ou (ii) en présence de NADPH 300 μ M, 6 μ g/mL de glutathion réductase (GR) de levure de boulanger, GSH 5 mM et 10 μ M de glutarédoxine chloroplastique GRX S16 ou (iii) en présence de NADPH 300 μ M et 6 μ g/mL de GR. Les protéines sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices et révélées par Western blot.

5) Test de réduction de la TRX z par les autres thiorédoxines plastidiales

La TRX z pré-oxydée (10 μ M) est incubée pendant 20 minutes en présence de 10 μ M de différentes thiorédoxines plastidiales recombinantes (TRX f1, m1, x ou y1), réduites au préalable avec 1 mM de DTT_{red}. Les protéines sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices et révélées par Western blot.

G. Recherche de cibles de TRX z

Dans le but d'identifier des cibles putatives et spécifiques de la TRX z, deux approches complémentaires de recherche de cibles ont été entreprises : une première en système levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (approche *in vivo*) et une seconde par protéomique (approche *in vitro*).

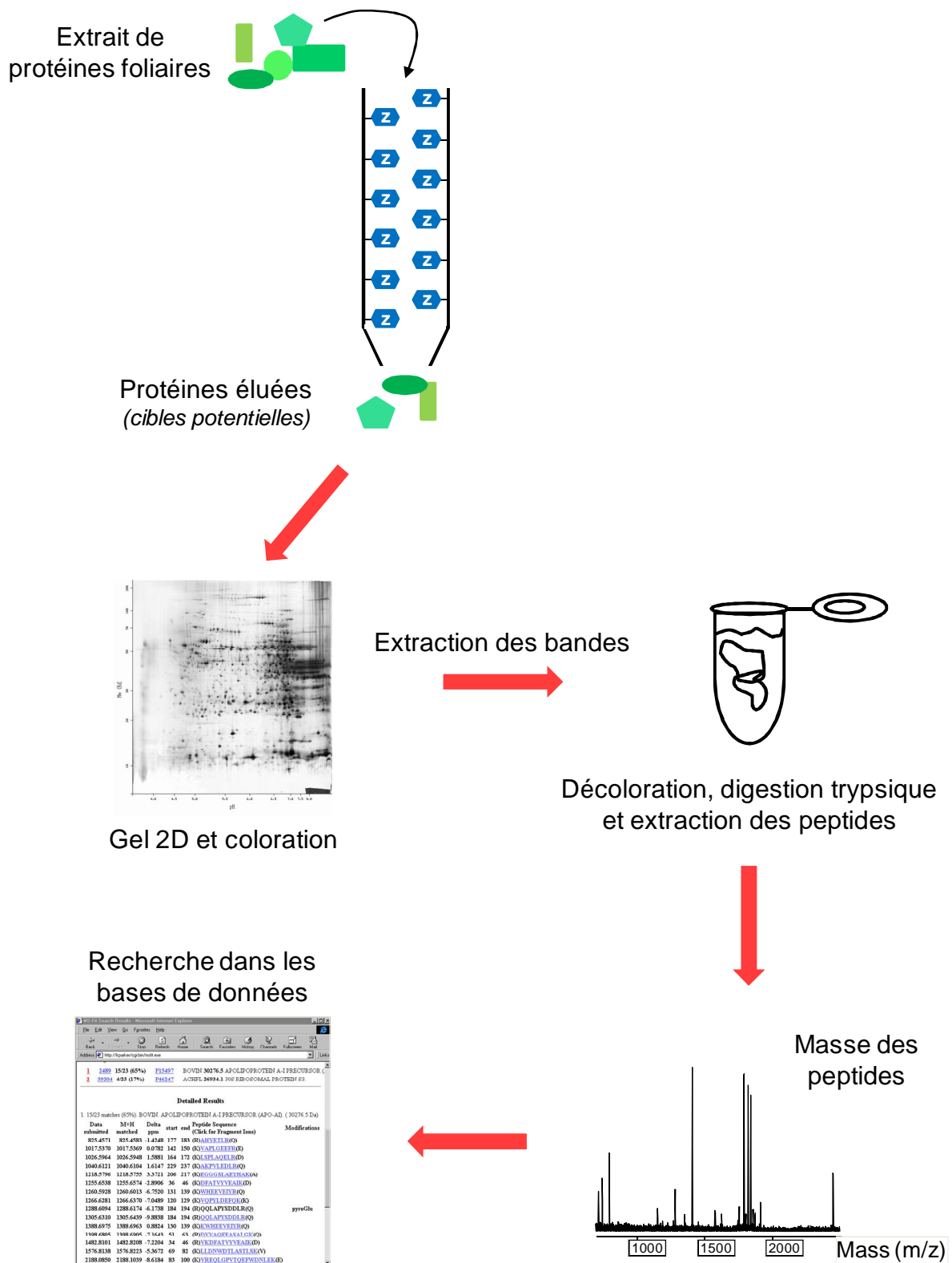


Figure 27 : Principe de la recherche et de l'identification de protéines cibles de la TRX z par colonne d'affinité.

1) Recherche de cibles de la TRX z par colonne d'affinité (approche *in vitro*)

Ce travail a été effectué en collaboration avec Paulette Decottignies au laboratoire « Pharmacologie et Biochimie de la Synapse » (IBBMC, Orsay). Le but de cette approche est d'identifier des cibles potentielles spécifiques de la TRX z et plus particulièrement des cibles qui interagissent avec la TRX z *via* des interactions électrostatiques (Figure 27). Pour cette raison, la colonne d'affinité de TRX z utilisée ici a été réalisée à partir de la forme native de la TRX z et non pas avec une forme mutée monocystéinique de TRX z, comme ce qui a pu être fait lors de la recherche de cibles des thiorédoxines plastidiales de type m3 ou y.

a) Greffage de TRX z sur la résine

Le greffage de la protéine TRX z recombinante consiste à accrocher cette protéine par ses résidus amines (NH_2) sur une résine activée au bromure de cyanogène (CNBr-activated Sepharose 4B ; GE Healthcare).

La résine est préalablement hydratée dans 7 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 1 mM par gramme de résine pendant 15 minutes. La résine est ensuite lavée successivement par 200 mL d'HCl 1 mM par gramme de résine puis par 15 mL (3 x 5 mL) d'eau et enfin par 15 mL (3 x 5 mL) de tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M. La protéine recombinante TRX z (2 mL soit 5,6 mg de protéine) est ensuite greffée à 4 mL de résine pendant 1 heure 30 à température ambiante en agitation sur roue. En parallèle, 2 mL de tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M sont ajoutés à 4 mL de résine afin de préparer la colonne témoin. L'efficacité du greffage est ensuite vérifiée par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Après le couplage, la résine est lavée par 15 mL (3 x 5 mL) de tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M puis bloquée par du tampon Tris-HCl 0,1 M ; NaCl 0,5 M pendant 2 heures à température ambiante en agitation sur roue. La résine est enfin lavée 3 fois successivement par 15 mL (3 x 5 mL) de tampon acétate 0,1 M ; NaCl 0,5 M, pH 4 et 15 mL (3 x 5 mL) de tampon Tris-HCl 0,1 M ; NaCl 0,5 M, pH 8. Les deux résines (TRX z et témoin) sont ensuite coulées dans deux colonnes distinctes.

b) Préparation des protéines solubles foliaires

Des feuilles de rosettes (20 g) de plantes cultivées en alternance jour/nuit, prélevées en fin de période d'obscurité (1 heure avant la reprise de la lumière), sont broyées dans un tampon d'extraction contenant : Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 ; EDTA 1 mM ; NaCl 100 mM, PVP insoluble 2 g/L, additionné d'inhibiteurs de protéases « spécial plantes » (1X, Sigma). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 18000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines solubles sont ensuite précipitées au sulfate d'ammonium 100% et reprises dans du tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 ; EDTA 1 mM puis dosées par la méthode BCA (section II. D. 1) a)).

La RuBisCO est partiellement éliminée de l'extrait de protéines solubles de feuilles par chromatographie d'exclusion (tamis moléculaire) sur colonne AcA 44 (limite d'exclusion à 200 kD) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 ; EDTA 1 mM ; NaCl 150 mM. Les différentes fractions récoltées ont été analysées sur gel SDS-PAGE : les fractions contenant le plus de RuBisCO ont été éliminées et les fractions appauvries en RuBisCO ont été conservées pour la suite de l'analyse.

c) Sélection des cibles de TRX z

L'extrait de protéines solubles de feuilles est chargé sur les colonnes TRX z et témoin préalablement équilibrées dans du tampon Tris-HCl 30 mM ; NaCl 50 mM. L'échantillon est laissé en contact sur la résine pendant 10 minutes à température ambiante. Chaque résine est ensuite lavée par 30 mL de tampon Tris-HCl 30 mM ; NaCl 50 mM puis les protéines sont éluées par du tampon Tris-HCl 30 mM ; NaCl 0,5 M. les résines sont ensuite lavées et conservées dans du tampon Tris-HCl 30 mM.

d) Identifications des cibles de TRX z

L'identification des cibles potentielles de la TRX z et le travail de préparation des échantillons préalable ont été réalisés par l'équipe de Paulette Decottignies au laboratoire de Pharmacologie et Biochimie de la Synapse (IBBMC, Orsay).

Les protéines éluées au NaCl 0,5 M (interactions électrostatiques avec la TRX z) sont concentrées et une partie de l'échantillon est séparée sur gel à gradient unidimensionnel (Mini Protean TGX Any kD, BioRad). Les protéines sont ensuite colorées au nitrate d'argent

(AgNO₃). Les bandes de protéines sont extraites manuellement puis décolorées par deux lavages dans une solution fraîchement préparée contenant : K₃ [Fe(CN)₆] 15 mM et Na₂S₂O₃ 50 mM. Par la suite, les protéines sont réduites et alkylées par des incubations successives dans du tampon NH₄HCO₃ 50 mM, DTT_{red} 10 mM pendant 30 minutes à 57°C puis dans du tampon NH₄HCO₃ 50 mM, IAM 55 mM pendant 20 minutes à température ambiante. Les protéines contenues dans le gel sont ensuite digérées à la trypsine (Promega) et les peptides sont extraits du gel à l'acide formique CH₃CN (ratio 1:60). Le mélange de peptides obtenu est ensuite envoyé pour analyse en spectrométrie de masse par MS/MS (Plateforme protéomique Paris Sud, Chatenay-Malabry) et les protéines sont identifiées à l'aide du logiciel « X!Tandem ».

Le reste de l'échantillon est précipité au TCA 12% puis le culot de protéines est lavé au bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 50 mM puis à l'eau. Le culot de protéines est réhydraté dans un tampon contenant : urée 8 M ; CHAPS 4% (p/v) ; DTT 20 mM ; Biolytes 0,2% (p/v) ; Bleu de Bromophénol 0,001% (p/v). Les protéines sont ensuite séparées sur gel bidimensionnel : dans un premier temps, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique dans un gradient non linéaire de pH 3 à 10 sur un IPG (Immobilized pH Gradient, BioRad) ; dans un second temps, les protéines sont séparées dans une deuxième dimension selon leur masse sur gel SDS-PAGE 12%. Les protéines sont ensuite colorées au nitrate d'argent. Les spots sont découpés et décolorés comme précédemment décrit et analysés en spectrométrie de masse par MS-MALDITOF comme décrit en Figure 27.

2) Criblage double hybride en système levure (approche *in vivo*)

Cette recherche de cibles putatives de la TRX z par une approche *in vivo* en système levure a pu être réalisée dans le laboratoire de Florence Vignols (IRD, Montpellier). Mon séjour a été financé par le Groupement de Recherche « TRX et GRX » auquel le laboratoire appartient.

Au cours de cette étude, deux souches de levures (décrites en section I. A. 2) a)) ont été utilisées. Une souche commerciale YRG2 et une souche qui en est dérivée, la souche CY306. L'importance de la souche CY306 dans cette étude est grande puisque celle-ci, du fait de la

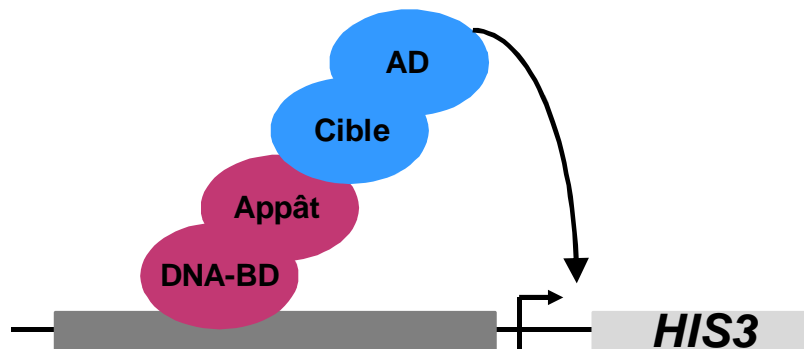


Figure 28 : Principe de l'interaction appât-cible chez la levure.

Dans la levure, lorsque les protéines de fusion DNA-BD :: appât et AD :: cible interagissent, cela entraîne la transcription du gène rapporteur *HIS3*. La souche de levure, incapable de croître sur milieu dépourvu d'histidine, retrouve alors son autotrophie sur milieu dépourvu en histidine.

Nom	Séquences 5' → 3'	Sites de restriction
TRXz-mature-up- <i>NdeI</i> (sens)	AAACATATGAAATTGTCAGCTCAAGAACTTC	<i>NdeI</i>
TRXz-mature-dw- <i>BamHI</i> (reverse)	GCTGGATCCTCACATCTCGTTGTCAATGAT	<i>BamHI</i>

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour les clonages pGADT7 :: TRX z et pGBKT7 :: TRX z.

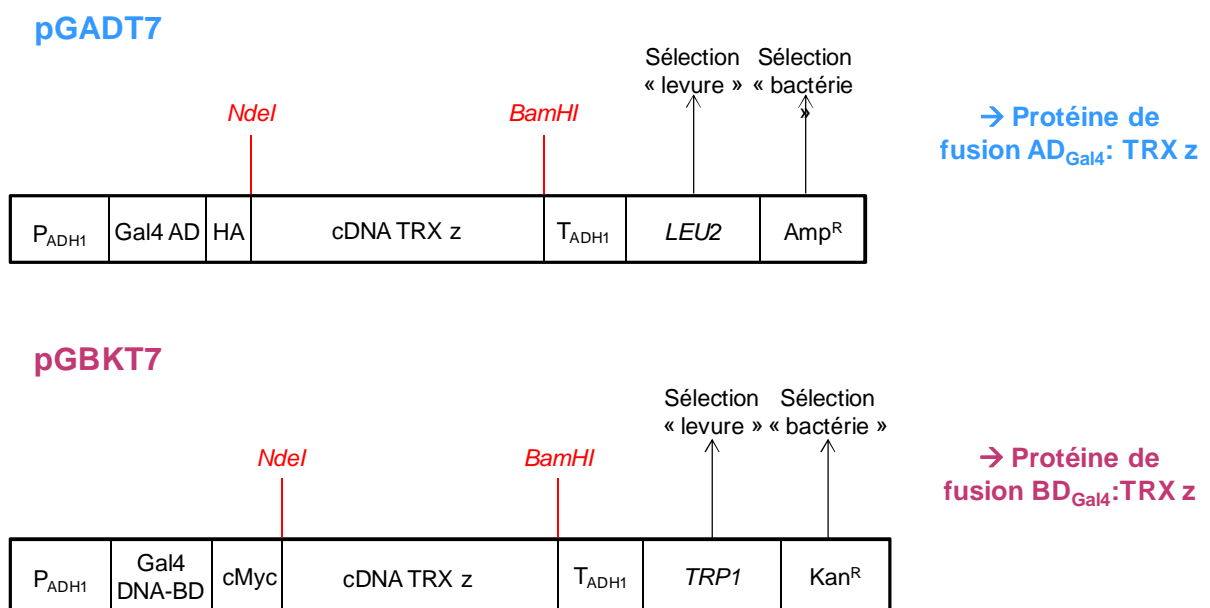


Figure 29 : Construits pGADT7 :: TRX z et pGBKT7 :: TRX z.

mutation des deux gènes codant pour les thiorédoxines endogènes (Vignols et al., 2005), représente un outil privilégié pour la recherche de cibles de TRX z par criblage : cela évite en effet les interactions des cibles potentielles de TRX z avec les thiorédoxines endogènes de levure et permet ainsi l'identification de protéines cibles spécifiques de TRX z.

Le principe général de cette technique (Figure 28) repose sur l'interaction entre l'appât (TRX z), dont l'ADNc est cloné en phase avec le domaine d'interaction à l'ADN (DNA-BD) et la cible potentielle, dont l'ADNc est cloné en phase avec le domaine d'activation de la transcription (AD). S'il y a interaction entre les protéines de fusion BD :: TRX z et AD :: cible, cela va entraîner la transcription du gène rapporteur *HIS3*. La souche CY306, incapable de croître sur milieu dépourvu d'histidine, retrouve alors son autotrophie sur milieu sélectif.

a) Clonage de l'ADNc de TRX z dans les vecteurs pGADT7 et pGBKT7

L'ADNc de la forme maturée (dépourvue du peptide d'adressage au chloroplaste, Lys79) de TRX z a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligonucléotides TRXz-mature-up-*NdeI* et TRXz-mature-dw-*BamHI* (Tableau 4) qui permettent d'introduire les sites de restriction *NdeI* et *BamHI* aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc respectivement.

Le clonage de l'ADNc de TRX z dans les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 (Figure 29) s'est déroulé selon les mêmes que celles précédemment décrites (section II. A. 1)). Cependant, (i) l'insert et les vecteurs ont été digérés par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* et (ii) les transformants ont été criblés par PCR sur colonies en utilisant les amorces AD2 (GGACCAAAGTGCCTATAACG ; s'hybride sur le domaine d'activation de la transcription AD) et TRXz-mature-dw-*BamHI*.

L'ADNc de TRX z a ainsi été cloné dans les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 en phase avec les domaines AD et DNA-BD respectivement.

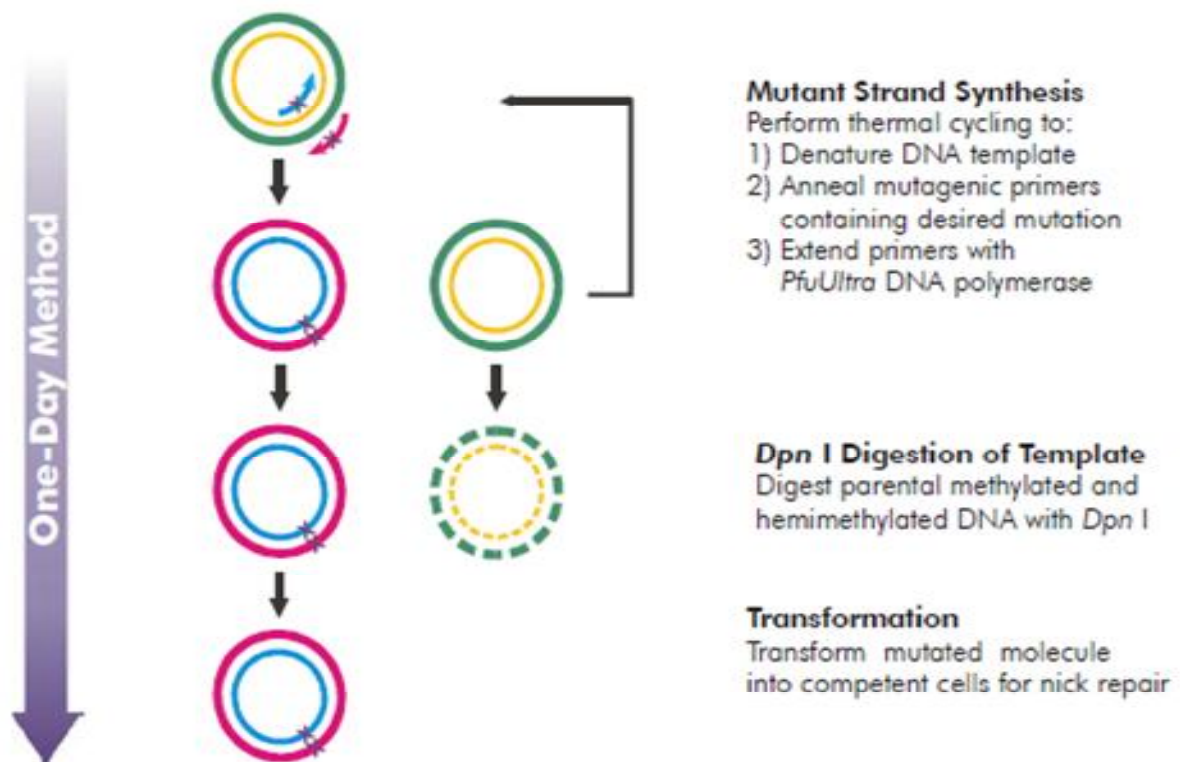


Figure 30 : Principe et méthodes du « QuickChange II Site-Directed mutagenesis kit ».

Couple d'amorces	Séquences 5' → 3'	Mutation intégrée
TRXz-C109S-up TRXz-C109S-dw	CATGGTGTGGACCTTCTATCTTGATGGCCCAG CTGGGCCATCAAGATAGAAGGTCCACACCATG	C109S
TRXz-C106S-up TRXz-C106S-dw	GATTTTATGCGACATGGTCTGGACCTTGTATCTTG CAAGATACAAGGTCCAGACCATGTGCGATAAAAATC	C106S
TRXz-C106/109S-up TRXz-C106/109S-dw	GATTTTATGCGACATGGTCTGGACCTTCTATCTTG CAAGATAGAAGGTCCAGACCATGTGCGATAAAAATC	C106S-C109S

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

b) Mutagénèse dirigée

La (les) mutations des cystéines régulatrices du site actif de la TRX z (Cys106 et Cys109) en résidus sérine est (sont) générée(s) lors d'une PCR effectuée en utilisant le kit « QuickChange II Site-Directed mutagenesis kit » (Stratagene, Figure 30) et selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, un couple d'amorces complémentaires spécifiques ayant intégré la (les) mutation(s) est utilisé (Tableau 5) et les matrices ADN utilisées sont les construits pGADT7/pGBKT7 :: TRX z précédemment décrits (Figure 29).

A la fin de cette étape de PCR, les vecteurs obtenus sont les vecteurs pGADT7/pGBKT7 :: TRX z^{C106S} ; pGADT7/pGBKT7 :: TRX z^{C109S} et pGADT7/pGBKT7 :: TRX z^{C106-109S}.

c) Transformation des levures

i. Transformation pour le criblage

Dans le cadre de l'identification de cibles de TRX z en système levure, deux cribles double hybride ont été réalisés en utilisant, d'une part, le « vecteur appât » (pGBKT7 :: TRX z ou pGBKT7 :: TRX z^{C109S}) et, d'autre part, la banque d'ADNc CD4-30 (tissus floraux ; Horwitz and Ma Two-Hybrid cDNA Library) dans laquelle les ADNc ont été clonés dans le vecteur pGADT7 en phase avec le domaine d'activation AD.

Dans un premier temps, la souche de levure (CY306 ou YRG2) est transformée avec le « vecteur appât » (pGBKT7 :: TRX z ou pGBKT7 :: TRX z^{C109S}), qui confère l'autotrophie pour le Tryptophane. Dans un deuxième temps, les levures qui portent l'appât sont transformées avec la banque d'ADNc, dont le vecteur confère l'autotrophie pour la Leucine. Les levures sont ensuite étalées sur milieu YNB gélosé sélectif et incubées à 30°C (fiches techniques en annexes 4 et 5).

La croissance des levures est ensuite suivie pendant trois semaines. Chaque colonie qui se développe (dit « clone positif ») est repiqué sur milieu YNB gélosé sélectif et analysé (voir ci-après).

ii. Transformation pour les tests d'interaction binaires

Le principe est ici de tester directement une interaction potentielle entre deux partenaires. Pour cela, les souches de levures sont transformées par les deux constructions

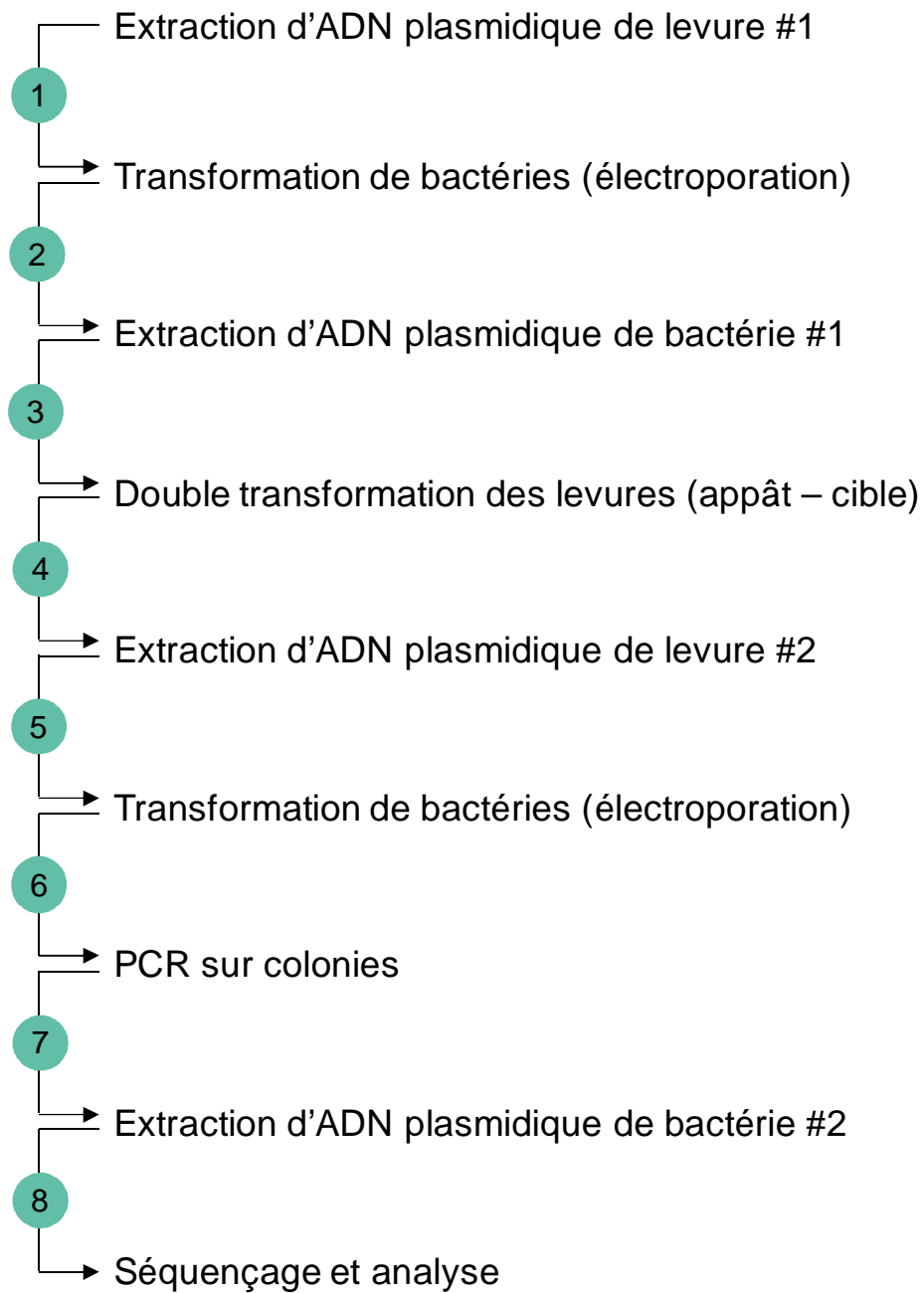


Figure 31 : Protocole d'analyse des clones positifs issus du criblage de la banque d'ADNc.

en même temps (pGADT7 et pGBKT7) et cultivées sur milieu YNB gélosé sélectif pendant 3 à 5 jours (fiches techniques en annexes 4 et 5).

d) Analyse des clones positifs

L'analyse des clones positifs se déroule en plusieurs étapes, résumées en Figure 31.

Dans un premier temps, l'ADN de chaque clone positif de levure est extrait (fiche technique en annexe 6). 2 µL d'ADN plasmidique de levure extrait sont ensuite utilisés pour transformer des bactéries compétentes (souche DH5α) par électroporation comme décrit précédemment (section II. A. 1) g)) (Figure 31, étape 1). Les bactéries sont ensuite directement mises en culture liquide à 37°C pour la nuit dans du milieu LB additionné en ampicilline (100 µg/mL), permettant ainsi la sélection du (des) vecteur(s) cible pGADT7 (étape 2). L'ADN plasmidique bactérien est ensuite extrait et purifié par la méthode de la lyse alcaline et précipitation au PEG décrite en annexe 3.

Afin de confirmer l'interaction binaire entre l'appât TRX z et la cible potentielle, une transformation de la souche de levure utilisée lors du criblage est réalisée en suivant la méthode décrite en section II G. 2) c) ii, avec la construction « appât » initialement utilisée lors du criblage et l'ADN plasmidique bactérien de chaque clone positif (étape 3). Les levures sont ensuite étalées sur milieu YNB gélosé sélectif et placées à 30°C pour 3 à 5 jours (étape 4).

Après croissance des levures, le protocole d'analyse reste le même : l'ADN des levures extrait est utilisé pour transformer la souche bactérienne DH5α par électroporation (étape 5). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu LB gélosé additionné en ampicilline (100 µg/mL) puis incubées à 37°C sur la nuit (étape 6). Une PCR sur colonies est réalisées en utilisant une paire d'oligonucléotides (AD2 et ADHTerm : GACTTGACCAAACCTCTGGC) qui s'hybrident sur le vecteur cible pGADT7, de part et d'autre de la séquence de l'ADNc cible (étape 7). Pour chaque clone analysé, l'ADN plasmidique bactérien est extrait puis séquencé (étape 8).

e) Tests d'interaction binaire

Après transformation et sélection des levures comme précédemment décrit (section II.G. 2) c) ii), celles-ci sont cultivées en milieu YNB liquide additionné en acides aminés et bases

nécessaires à la croissance des levures (HUKAM) à 30°C sur la nuit. Les cultures de cellules transformées sont ensuite diluées successivement (DO_{600nm} 5.10^{-1} ; 5.10^{-2} et 5.10^{-3}) puis 7 μ L de chaque dilution sont déposés sur milieu YNB gélosé additionné en acides aminés et bases avec ou sans histidine (contrôle ou test d'interaction binaire), et en présence ou non de 3-aminotriazole (3AT) 5 mM (inhibiteur compétitif du produit du gène rapporteur *HIS3*, l'ajout de 3AT au milieu de culture augmente sa stringence). L'interaction binaire est visualisée après 4 à 5 jours de croissance à 30°C.

H. Etude fonctionnelle de la TRX z

1) Analyse de l'expression de la TRX z et des autres thiorédoxines plastidiales dans différentes conditions de lumière

L'expression de la TRX z, ainsi que celle des autres thiorédoxines plastidiales, a tout d'abord été suivie chez *Arabidopsis thaliana* dans les différents organes (racines, feuilles, jeunes siliques et siliques matures, fleurs, jeunes plantules et graines). L'expression des thiorédoxines plastidiales en fonction des conditions d'éclairement (alternance jour/nuit, obscurité continue seule ou suivie d'une heure d'éclairement) et lors de cycles circadiens successifs a ensuite été étudiée.

a) Échantillonnage

L'analyse de l'expression des thiorédoxines plastidiales selon les conditions d'éclairement a été réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis* (Col-0) de 10 jours cultivées en alternance jour/nuit ou en obscurité totale et sur des plantules étiolées ayant subi un traitement de 1 heure de lumière (voir les conditions de culture en section I.B.2)b)).

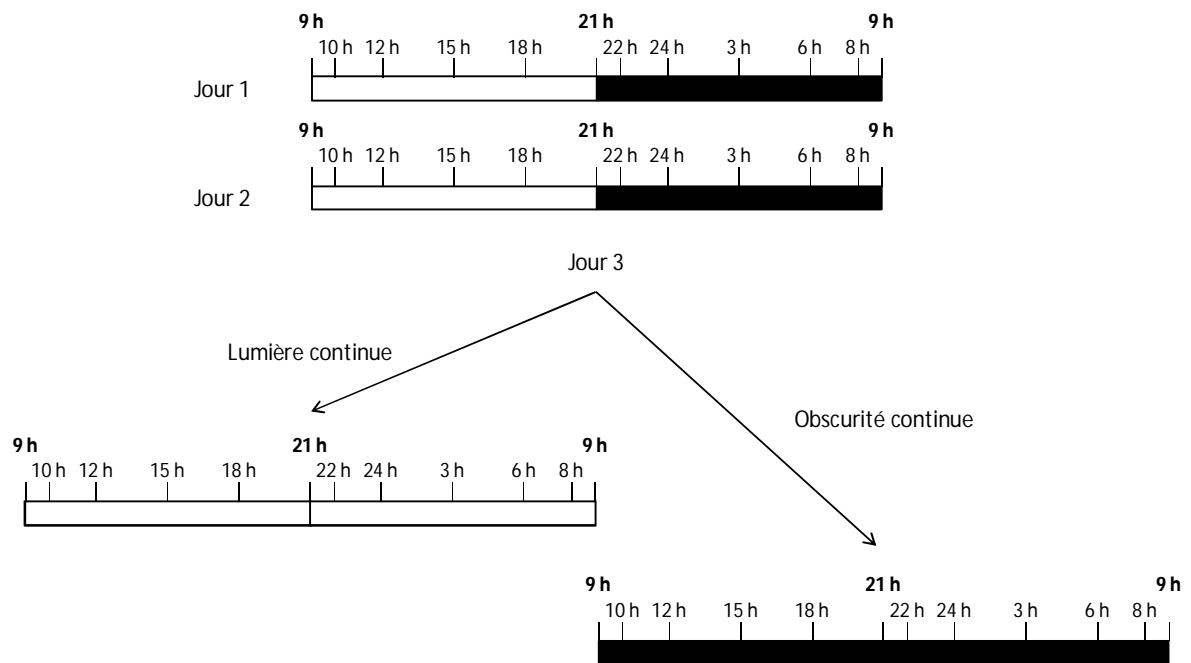


Figure 32 : Échantillonnage au cours du cycle circadien.

Les plantes sont cultivées pendant 6 semaines avec une photopériode 12 heures/12 heures. Les prélèvements sont effectués dans ces conditions pour les deux premiers jours. Au troisième jour, les plantes sont transférées en condition de lumière continue ou d'obscurité continue. Les prélèvements sont faits aux heures indiquées. Rectangles blancs : jour ; rectangles noirs : obscurité.

L'expression des thiorédoxines plastidiales lors de cycles circadiens successifs a été réalisée sur des feuilles de rosettes de plantes de 6 semaines. Les prélèvements ont été effectués sur une période de 3 jours. Pendant les deux premiers jours, les plantes sont cultivées en condition normale d'alternance jour (12 heures)/nuit (12 heures). Lors du troisième jour, les plantes sont transférées et cultivées soit en lumière continue soit en obscurité continue. L'échantillonnage est réalisé au cours de ces trois jours selon la fréquence décrite en Figure 32.

b) Extraction des ARN totaux de feuilles

Les ARN totaux sont extraits par le kit « NucleoSpin RNA II » (Macherey-Nagel). Les échantillons sont broyés en poudre fine (extracteur à billes : 2 fois 30 secondes à 30 coups par minute) et repris dans le tampon de lyse. Lors de la purification des ARN, l'ADN génomique contaminant est éliminé par traitement à la DNase I. Les ARN sont élués par 40 μ L d'eau RNase-free et dosés par spectrophotométrie au Nanodrop. Leur pureté est vérifiée sur gel d'agarose 1% (section II.A.1)b)).

c) Reverse transcription

Cette étape consiste à synthétiser le brin d'ADN complémentaire (ADNc) au brin d'ARN messenger (ARNm) à partir d'une amorce. La reverse transcription est réalisée avec le kit SuperScript II First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Pour les expériences réalisées ici, 500 ng à 1 μ g d'ARN sont utilisés.

Gènes cibles	Nom des amorces	Séquences 5' → 3' des amorces	Expérience
<i>TRX f1</i>	qPCRf1sens1	ACGACGACGTTGTGTTTCTAAAG	Tests de conditions d'éclairement Et Cycle circadien
	qPCRf1rev1	CTTCCTTGACAACCTTGTTATCC	
<i>Trx f2</i>	qPCRf2sens1	AGCTATCGGAGAAGTACCAGGAC	
	qPCRf2rev1	CTTCAATGGCTGCAAGTAAGTCT	
<i>TRX m1</i>	qPCRm1sens1	TAACACTGATGAGTCTCCTGCAA	
	qPCRm1rev1	GATGCTGGTTGCTAAAGTGTCTT	
<i>TRX m2</i>	qPCRm2sens1	TGAAGCTCAGGAACTACTACCG	
	qPCRm2rev1	CAGTGTAATGCTGTGCTAGATCG	
<i>TRX m3</i>	qPCRm3sens2	AGTTACACAACGATCATGGGAAG	
	qPCRm3rev2	CGTCTATTATCCTGTGGACCATC	
<i>TRx m4</i>	qPCRm4sens1	TATGATTCACCCCATAGTTGACC	
	qPCRm4rev1	CTATCTTTCTTCTCACCGCCTTT	
<i>TRX x</i>	qPCRxsens1	CAGCTATGGAAGCCTTATCTCAG	
	qPCRxrev1	GTAATAGCACCTCCCTTCTGCT	
<i>TRX y1</i>	qPCRy1sens1	GAGGCACTTCCTACTTTTCATCCT	
	qPCRy1rev1	GTTTCATGATCCAACTATGGCTTC	
<i>TRX y2</i>	qPCRy2sens1	CTGAGAAGTACCCAAGTCTTGCT	
	qPCRy2rev1	GAATTCTCAATACGCTCAACGAG	
<i>TRX z</i>	QPCR-TRXz-S1	CCGTGTTGTTTGCAATTTGAG	Tests de conditions d'éclairement
	QPCR-TRXz-R1	GGATCCGACCAGATCAACAG	
<i>PP2A</i>	qPCRPP2Asens1	GATGCAATCTCTCATTCCGATAG	Tests de conditions d'éclairement
	qPCRPP2Arev1	AGAGCTTGATTTGCCAAATACC	
<i>CCA1*</i>	CCA1-F	GGGGTGTGAATGATGGAAAAGA	Cycle circadien
	CCA1-R	CGATCTTCATTGGCCATCTCAG	
<i>TOC1</i>	qTOC1-F	ATCTTCGCAGAGTCCCTGTGATA	
	qTOC1-R	GCACCTAGCTTCAAGCACTTTACA	
<i>ACT2</i>	qACT2-F	GTGGATTCCAGCAGCTTCCAT	
	qACT2-R	GCTGAGAGATTGAGATGCCCA	

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les analyses de niveaux de transcrits par PCR quantitative en temps réel.

Les orientations de chaque amorce sont indiquées dans le nom de l'amorce (sens et reverse).

(* : Lu et al. 2009)

d) PCR quantitative en temps réel

Le niveau d'expression des gènes est analysé par PCR quantitative en temps réel. Cette technique de PCR utilise des ADNc et nécessite des couples d'amorces spécifiques aux gènes testés (Tableau 6). L'efficacité de chaque couple d'amorce est au préalable testée et validée sur une série de dilutions d'ADNc (dilutions $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5^{\text{ème}}}$, $\frac{1}{20^{\text{ème}}}$, $\frac{1}{100^{\text{ème}}}$, $\frac{1}{1000^{\text{ème}}}$, $\frac{1}{10000^{\text{ème}}}$). Si la constante d'efficacité du couple d'amorces est comprise entre 90 et 100%, celui-ci est validé.

Dans un volume final de 15 μ L, les réactions sont réalisées avec 5 ng/5 μ L d'ADNc, 2,5 μ L de mélange contenant 250 nM des amorces sens et reverse du gène à tester et 7,5 μ L de réactif SYBR Green 2X (Roche Diagnostics) sur plaque 96 puits scellées par un film optique thermocollant. Les réactions sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (LightCycle 480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science). Le protocole d'amplification est le suivant : (i) activation à 95°C pendant 10 minutes, (ii) 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 20 secondes, 72°C pendant 15 secondes et 95°C pendant 30 secondes). Les courbes de fusion sont obtenues après chaque réaction entre 65°C et 95°C. Les résultats sont standardisés par rapport à un gène de référence (*PP2A* ou *ACT2*) dont l'expression est constante pour l'ensemble des conditions. La quantification de l'expression des gènes est calculée par la méthode des CT comparatifs (Livak and Schmittgen, 2001).

2) Etude du rôle de la TRX z dans la réponse immune innée (approche par génétique inverse)

a) Géotypage des mutants d'insertion *trx z*

Les mutants d'insertion sont identifiés en cherchant les séquences flanquantes d'ADN-T (« Flanking Sequence Tag », FST) ayant une homologie de séquence avec le locus d'intérêt. Cette recherche est effectuée par un blast sur le site web TAIR (« The Arabidopsis Information Resource » <http://www.arabidopsis.org/>). Les FST données par la banque NASC sont issues du séquençage à partir du bord gauche de l'ADN-T.

Nom	Séquences 5' → 3'	Utilisation
TRXz-E1-Sens	TCCAGAACTTTTCCACACCTC	Génotypage des mutants dont l'insertion se trouve dans le premier intron du gène AtTRX z
TRXz-I1-Rev	GTGGAAGCCTCACTGATTCT	
QPCR-TRXz-S1	CCGTGTTGTTTGCAATTTGAG	Génotypage des mutants dont l'insertion se trouve dans la partie 3'UTR du gène AtTRX z
TRXz-3UTR-Rev	GGAAGAGAGAGATATGACGTCATT	
New LB1	TGGACCGCTTGCAACTCTC	Oligonucléotide spécifique du bord gauche du T-DNA de la banque SALK

Tableau 7 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le génotypage par PCR.

Les mutants d'insertion sont génotypés au locus d'intérêt par PCR. Dans un premier temps, l'ADN génomique des mutants d'insertion est extrait par une méthode rapide puis le site d'insertion suggéré par la FST est vérifié au niveau de la bordure gauche de l'insert.

i. Extraction rapide d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana*

Une feuille de plantule au stade 6-8 feuilles est broyée dans un tampon d'extraction Tris-HCl 200 mM, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,5% (v/v), pH 7,9. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 14000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Les acides nucléiques sont précipités avec 1 volume d'isopropanol puis le culot est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 70% froid. Le culot est enfin repris dans 50 µL de TE.

ii. Génotypage par PCR

Le locus sauvage est détecté en utilisant les oligonucléotides placés en amont et en aval du site d'insertion de l'ADN-T. Le locus mutant est détecté en utilisant un oligonucléotide placé au niveau de la FST et un autre sur la bordure gauche de l'ADN-T (New LB1) (Tableau 7). La PCR est réalisée en présence de 2 µL d'ADN génomique. La présence et la taille des produits PCR sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose.

b) Traitement à la flagelline 22 (flg 22)

La réponse immune innée est déclenchée par infiltration de flg 22, un peptide de synthèse de 22 acides aminés (séquence QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA) (AnaSpec) qui couvre le domaine conservé nécessaire pour l'induction des réponses de défense dans les cellules végétales (Meindl et al., 2000; Ramos et al., 2004). Une infiltration des cellules végétales avec la flg 22 permet de mimer une attaque bactérienne et ainsi de déclencher la réponse immune innée (résistance basale) chez la plante. Les plantes de 6 semaines (Col-0 et mutant *trx z*) ont été traitées par infiltration à l'aide d'une seringue sans embout. Pour chaque plante, une feuille est infiltrée avec de l'eau (« mock », témoin) et une feuille est infiltrée avec la solution aqueuse de flg 22. Les feuilles sont ensuite récoltées et congelées dans l'azote liquide.

i. Analyse transcriptionnelle

Le niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales en réponse à la flg22 (100 nM) ainsi que le niveau de transcrits de deux gènes marqueurs de la PTI (« PAMP-Triggered Immunity »),

Gènes cibles	Nom	Séquences 5' → 3'
<i>FRK1</i>	qFRK1-F	ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC
	qFRK1-R	TGCAGCGCAAGGACTAGAG
<i>At2g17740</i>	qAt2g17740-F	TGCTCCATCTCTCTTTGTGC
	qAt2g17740-R	ATGCGTTGCTGAAGAAGAGG
<i>U-box</i>	qUbox-F	TGCGCTGCCAGATAATACTATT
	qUbox-R	TGCTGCCCCAACATCAGGTT

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour les analyses de niveaux de transcrits en réponse à la flg 22 par PCR quantitative en temps réel.

Nom	Séquence 5' → 3'	Sites de restriction
TRXz-GFP-up (sens)	GGGGGATCCATGGCTCTTGTCAATCCA	<i>BamHI</i>
TRXz-GFP-dw (reverse)	CTCCTCGAGGCCATCTCGTTGTCAATGATATCGTGC	<i>XhoI</i>

Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées pour le clonage pENTR3C :: TRX z.

FRK1 (Flagellin Response Kinase 1) et *At2g17740* (Shan et al., 2008; Albrecht et al., 2012) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. Les résultats ont été standardisés par rapport au gène de référence *U-box* (Tableau 8).

ii. Analyse de l'activation des MAP-kinases 3 et 6 par Western blot

L'état d'activation (phosphorylation) des MAPK3 et 6 en réponse à la flg22 (1 μ M) a été suivi par Western blot comme précédemment décrit. Un anticorps primaire spécifique des MAPK phosphorylées (α -phospho-p44/p42-ERK, α -MAPKact ; Cell Signalling Technology, <http://www.cellsignal.com/>) a été utilisé à une dilution de 1/1000^{ème}. La quantification du signal obtenu est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

3) Obtention de lignées TRX z-GFP

L'ADNc de la TRX z dans sa forme native (avec le peptide de transit, Met1) a été cloné dans le vecteur pENTR3C (Invitrogen) en utilisant les amorces TRXz-GFP-up et TRXz-GFP-down (Tableau 9).

Après vérification par séquençage, le vecteur pENTR3C :: TRX z a été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nco*I et l'insert TRX z a été intégré dans le vecteur pB7WG2.0. La séquence codant pour la GFP (« Green Fluorescent Protein ») a ainsi été clonée en position C-terminale et en phase avec la séquence codant pour la TRX z, sous le contrôle du promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Par ailleurs, un gène de résistance au Basta est également présent.

Par la suite, la souche bactérienne *Agrobacterium tumefaciens* a été transformée avec la construction pB7WG2 :: TRX z. Les colonies transformées ont ensuite été mises en culture en présence de ryfampicine 50 μ g/mL à 30°C pendant 24 heures. Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia) ont été transformées par trempage des boutons floraux dans la solution de bactéries (« floral dip »). Les graines des plantes transformées ont été semées sur milieu sélectif contenant du Basta et les transformants (T1) ont été isolés. Les graines issues de la génération T1 de transformants ont de nouveau été semées sur milieu sélectif contenant du Basta et les transformants ont été isolés (T2).

Résultats

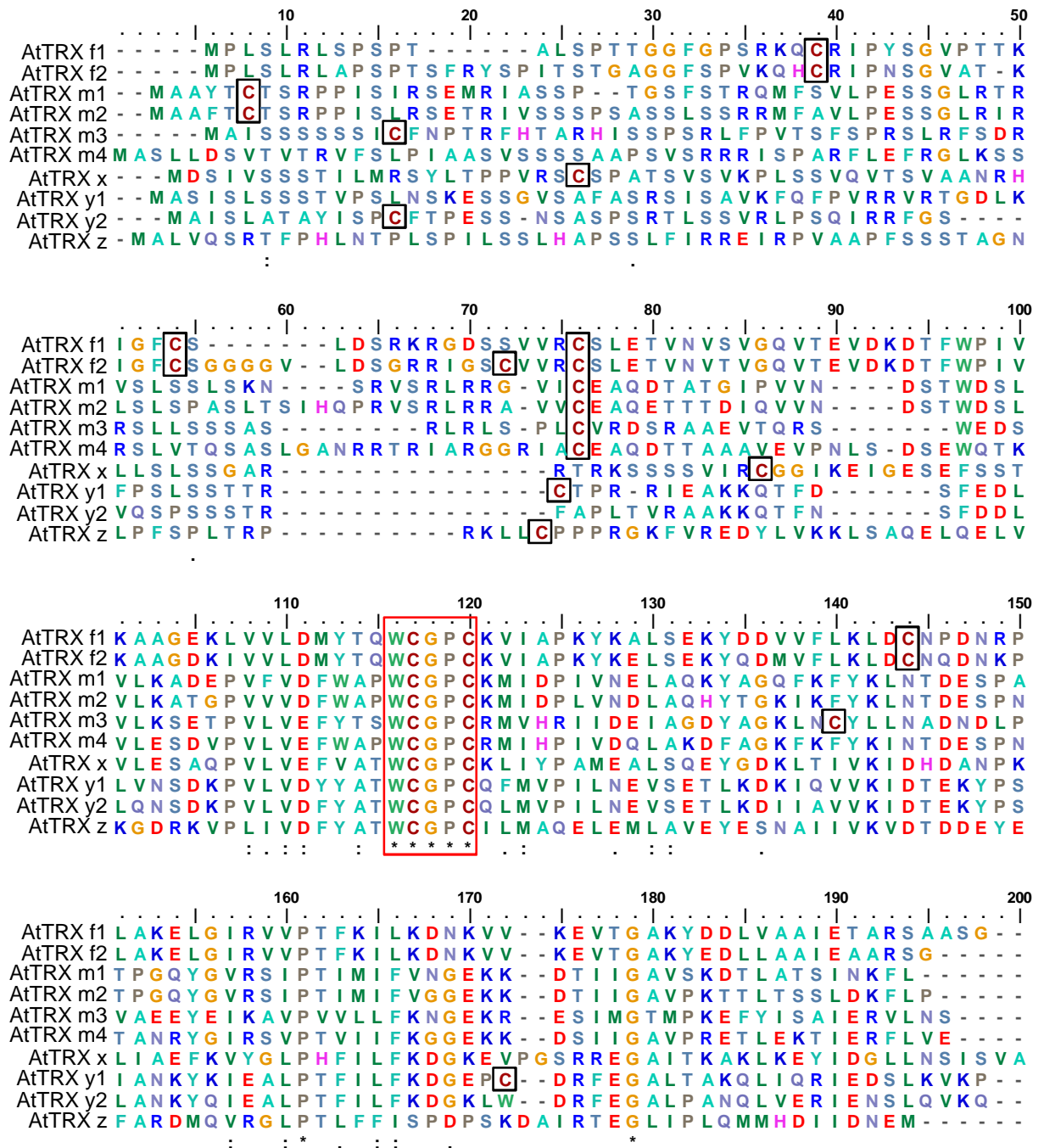


Figure 33: Alignement de séquences protéiques des thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis thaliana*.

L'alignement des séquences protéiques des dix thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis* a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalW. Le site actif WCGPC, commun à toutes les thiorédoxines, est encadré en rouge. Les résidus cystéine additionnels sont encadrés en noir.

I. Analyses préliminaires de la TRX z

En 2009, au commencement de ma thèse, aucune étude n'avait permis de démontrer expérimentalement la localisation subcellulaire de la TRX z. Mon travail a ainsi débuté par l'analyse préliminaire de la séquence protéique de la TRX z.

Dans un premier temps, un alignement de la séquence primaire de la TRX z avec les séquences primaires des autres thiorédoxines plastidiales connues d'*Arabidopsis thaliana* a permis de confirmer la présence du site actif conservé WCGPC au sein de la séquence protéique de la TRX z, signature caractéristique des thiorédoxines (Figure 33).

Par la suite, l'analyse de prédiction de localisation subcellulaire de la TRX z à l'aide de divers logiciels de prédiction (ChloroP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP> ; TargetP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> ; Predotar : <http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html> ; PSort : <http://wolfsort.org/>) ainsi que des études *in silico* m'ont permis d'identifier un peptide d'adressage au chloroplaste (Figure 34 A). La forme maturée de la TRX z, dépourvue de son peptide d'adressage, a donc une masse moléculaire de 12 kDa. Cela suggérait que la TRX z pouvait être la dixième thiorédoxine plastidiale chez *Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, il était nécessaire d'identifier précisément la séquence correspondant au peptide d'adressage aux plastes de la TRX z pour la suite de l'étude et plus particulièrement pour l'étape de production et purification de la protéine recombinante maturée. Le logiciel de prédiction ChloroP indiquait que le peptide d'adressage aux plastes correspondait aux 81 premiers acides aminés de la séquence protéique. Cependant, des analyses de spectrométrie de masse réalisées sur des protéines chloroplastiques (« The Plant Proteome Database », <http://ppdb.tc.cornell.edu/dbsearch/gene.aspx?id=12002>) et dont les données sont accessibles m'ont permis de redéfinir la taille du peptide d'adressage. En effet, les trois derniers acides aminés du peptide d'adressage font partie d'une séquence caractéristique de protéine chloroplastique identifiée par MS/MS (Figure 34 B). De ce fait, pour la suite du travail, nous avons considéré que le peptide d'adressage aux plastes de la TRX z correspond aux 78 premiers acides aminés de la séquence protéique (Figure 34 C).

A

Source	Compartiments	Pertinence
Predotar	Mitocondries	0.23
	Plastes	0.32
	Retuculum Endoplasmique	0.01
Target P	Chloroplastes	0.858
	Mitocondries	0.341
Chloro P	Chloroplastes	0.563
PSort	Noyau	0.880
	Membranes des thylacoïdes	0.28
	Stroma	0.2
	Lumen	0.2

B

MALVQSRTFPHLNTPLSSLHAP
 SSLFIRREIRPVAAPFSSSTAGNLPFS
 PLTRPRKLLCPPPRGKFVREDYLVKK
LSAQELQELVKGDRKVPLIVDFYATW
 CGPCILMAQELEMLAVEYESNAIIVKV
DTDDEYEFARDMQVRGLPTLFFISPD
 PSKDAIRTEGLIPLQMMHDIIDNEM

C

MALVQSRTFPHLNTPLSSLHAP
 SSLFIRREIRPVAAPFSSSTAGNLPFS
 PLTRPRKLLCPPPRGKFVREDYLVKK
 LSAQELQELVKGDRKVPLIVDFYATW
CGPCILMAQELEMLAVEYESNAIIVK
 VDTDDEYEFARDMQVRGLPTLFFISPD
 DPSKDAIRTEGLIPLQMMHDIIDNEM

Figure 34 : Identification du peptide d'adressage aux chloroplastes de la TRX z.

A, Prédiction de la localisation subcellulaire de la TRX z ; B, Peptides identifiés en spectrométrie de masse lors de la recherche de protéines chloroplastiques (PPDB) et peptide d'adressage aux plastes prédit par le logiciel ChloroP (souligné) ; C, Séquence primaire de la TRX z (peptide d'adressage au chloroplaste et site actif).

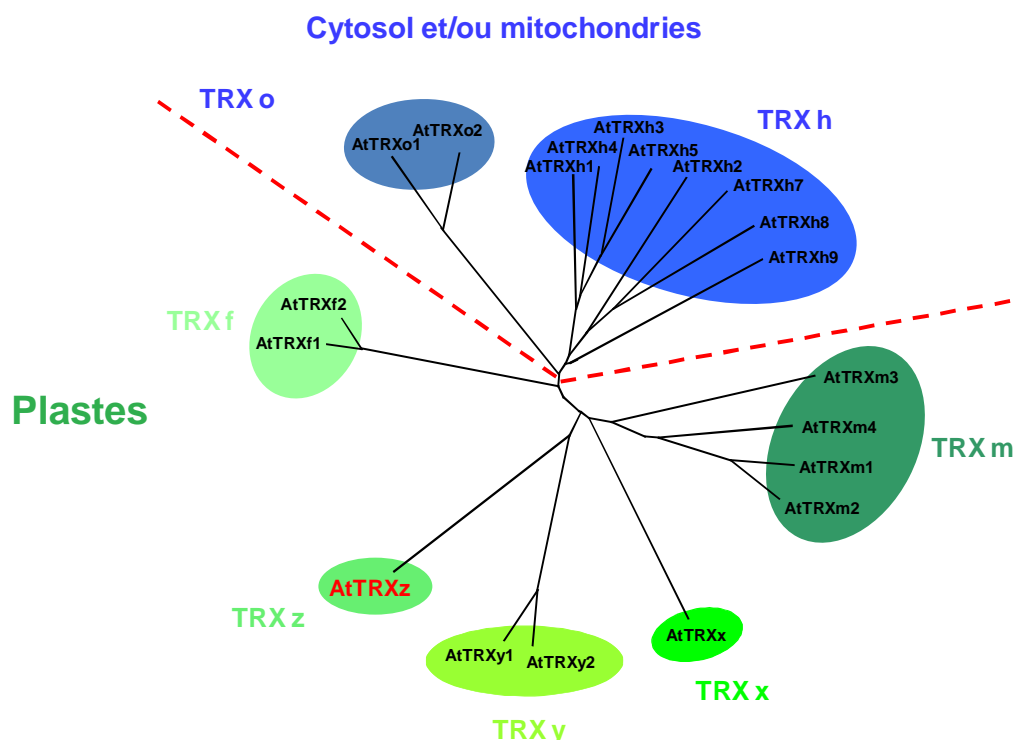


Figure 35 : Les thiorédoxines chez Arabidopsis thaliana.

Parmi la sous-classe des thiorédoxines plastidiales, la TRX z est l'unique représentante du cinquième type, amenant ainsi à dix le nombre de thiorédoxines plastidiales chez Arabidopsis.

Par ailleurs, dans sa forme maturée, la TRX z ne présente au sein de sa séquence que deux résidus cystéine, qui correspondent aux deux résidus trouvés dans le site actif conservé WCGPC. Un troisième résidu cystéine est présent dans le peptide d'adressage.

Bien que plusieurs analyses du protéome chloroplastique identifient la TRX z, suggérant ainsi sa localisation au chloroplaste (Kleffmann et al., 2004; Giacomelli et al., 2006; Pfalz et al., 2006), afin de valider expérimentalement la localisation subcellulaire de la TRX z, l'obtention de lignées transgéniques exprimant la TRX z fusionnée à une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein) a été initiée. La validation de la localisation aux plastides de la TRX z a cependant été publiée avant que les lignées TRX z::GFP aient été obtenues au laboratoire, apportant ainsi la confirmation expérimentale que la TRX z est bien adressée aux plastides (Meng et al., 2010).

L'ensemble de ces premières données nous a alors permis de placer la TRX z sur l'arbre phylogénétique des thiorédoxines d'*Arabidopsis thaliana*. La TRX z appartient bien à la sous-classe des thiorédoxines plastidiales, définissant ainsi un nouveau type de thiorédoxine plastidiale, et est proche des thiorédoxines de type y (Figure 35), d'où sa dénomination TRX z.

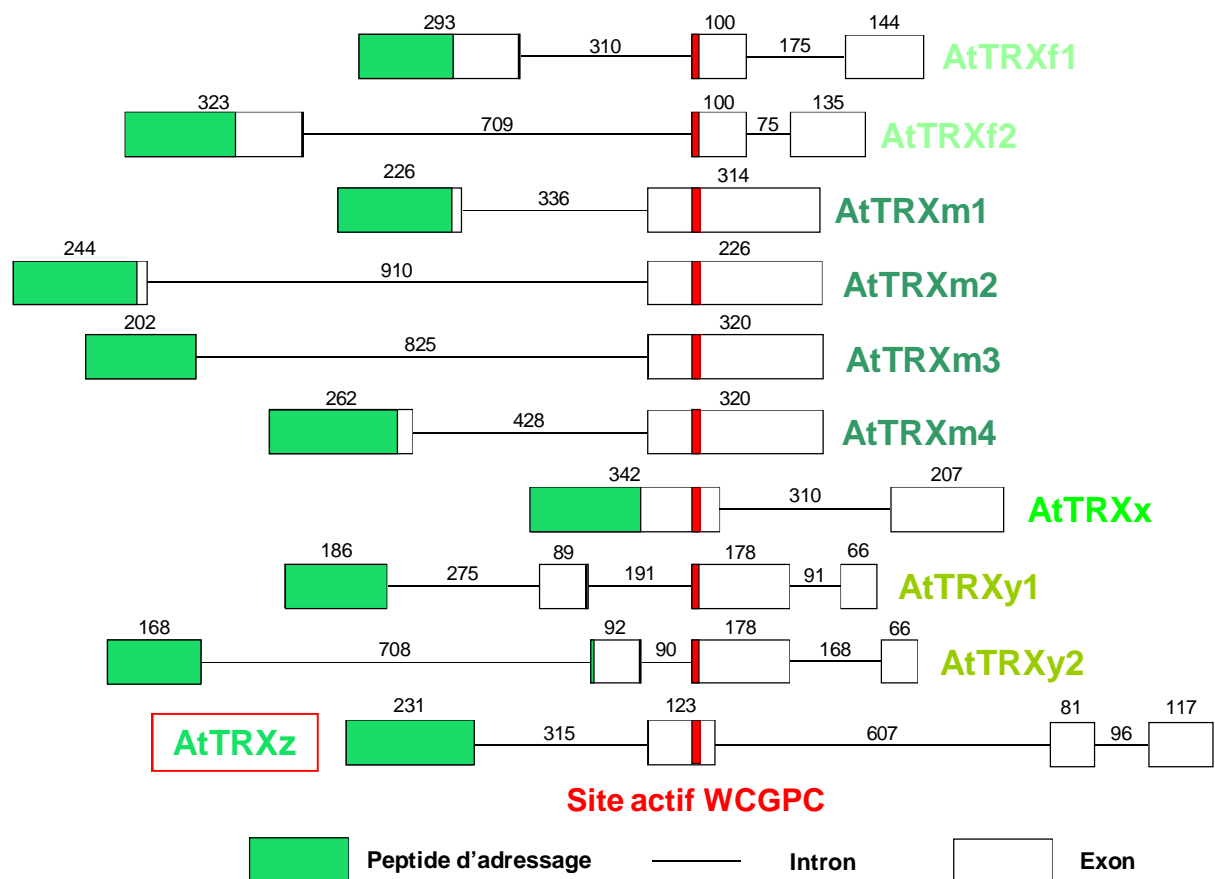


Figure 36 : Structure génique des thiorédoxines plastidiales chez *Arabidopsis thaliana*.

Chaque type de thiorédoxine plastidiale présente une structure génique particulière, les représentants d'un même type partageant la même structure de gène.

L'analyse de la structure génique des thiorédoxines plastidiales confirme d'ailleurs que la TRX z définit bien un nouveau type. En effet, chaque type de thiorédoxine (f, m, x et y) présente une structure génique particulière, partagée par tous les membres d'un même type (Figure 36). Ainsi, les TRX de type f présentent 3 exons et 2 introns, le peptide d'adressage correspondant approximativement à la moitié du premier exon, le site actif étant situé au début du deuxième exon. Les gènes codant les quatre TRX de type m sont composés de deux exons et un intron, le premier exon contenant le peptide d'adressage et le site actif étant présent dans le deuxième exon. Pour les TRX de type y, les gènes sont composés de quatre exons et trois introns : le premier exon correspond dans sa totalité au peptide d'adressage et le site actif est partagé entre la fin du deuxième exon et le début du troisième exon. Enfin, le gène codant la TRX x est composé de deux exons et un intron, tout comme les TRX de type m, mais le site actif WCGPC est présent dans le premier exon du gène. Le gène codant la TRX z présente une structure différente et unique, qui confirme que la TRX z définit le cinquième type de thiorédoxine plastidiale : le gène est composé de quatre exons et trois introns, la totalité du premier exon codant le peptide d'adressage de la protéine. Le site actif WCGPC est présent dans le second exon.

Comme il était certain que la TRX z était bien une nouvelle thiorédoxine plastidiale, sa caractérisation biochimique pouvait être réalisée. La première étape de ce travail a consisté à cloner, produire et purifier la TRX z d'*Arabidopsis thaliana* sous forme recombinante et sans étiquette, comme cela a été fait précédemment au laboratoire pour les neuf autres thiorédoxines plastidiales (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004).

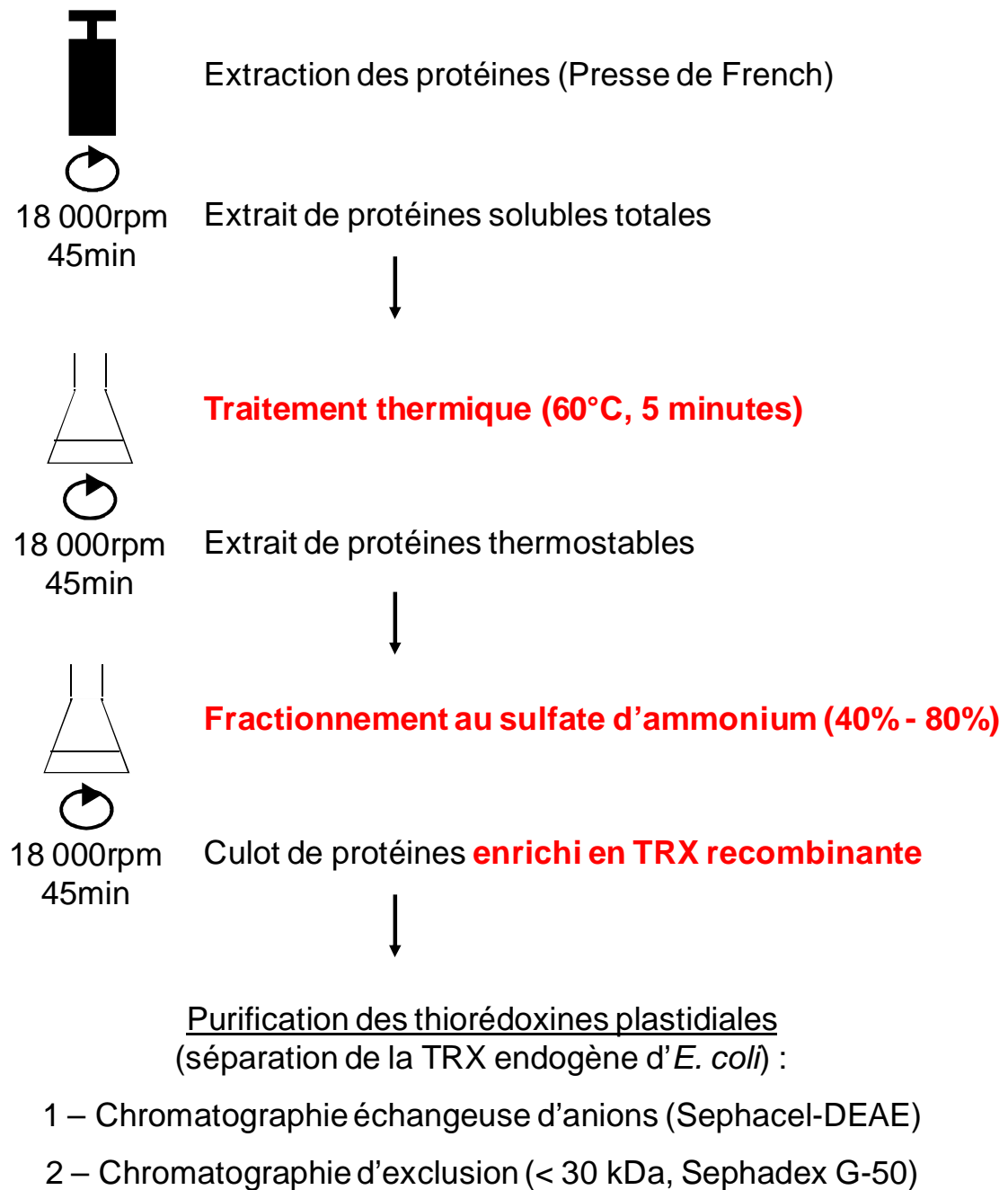


Figure 37: Protocole classique de purification des thiorédoxines plastidiales utilisé au laboratoire.

Les protéines solubles totales, extraites par trois passages en presse de French, sont récoltées. Après un traitement thermique de 5 minutes à 60°C, les protéines solubles thermostables sont fractionnées au sulfate d'ammonium (41% - 80%). Le culot de protéines est ainsi enrichi en thiorédoxine recombinante. Celle-ci est alors purifiée par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions suivie d'une chromatographie d'exclusion (tamis moléculaire).

II. Clonage, production et purification de la TRX z recombinante non étiquetée

Dans un premier temps, la forme maturée de la TRX z (Lys79), dépourvue de son peptide d'adressage aux plastes, a été clonée dans un vecteur d'expression de type pET dans le but d'obtenir une protéine recombinante non étiquetée. Par la suite, la protéine recombinante a été produite en système hétérologue chez *Escherichia coli* en vue de sa purification.

L'absence d'étiquette (ou tag) fusionnée à la protéine recombinante empêche de modifier son comportement ou son activité (Wu and Filutowicz, 1999; Ramage et al., 2002).

Un protocole de purification développé au laboratoire pour la purification de thiorédoxines de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Stein et al., 1995) a été utilisé. Ce même protocole a permis de purifier avec succès les neuf autres thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis* au laboratoire (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004) (Figure 37).

A. Purification de la TRX z recombinante avec le protocole classique

Dans un premier temps, après transformation des bactéries *d'E. coli* par la construction pET-16b :: TRX z, la production de la TRX z recombinante à différentes températures (37°C, 30°C et 23°C) a été testée. Comme pour l'ensemble des thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis*, exceptée la TRX m3, la production de la TRX z s'effectue très bien lorsque les cellules bactériennes sont cultivées à 30°C toute la nuit.

Suite à la production de la protéine recombinante et après extraction des protéines solubles totales, la protéine est soumise à plusieurs étapes d'enrichissement successives.

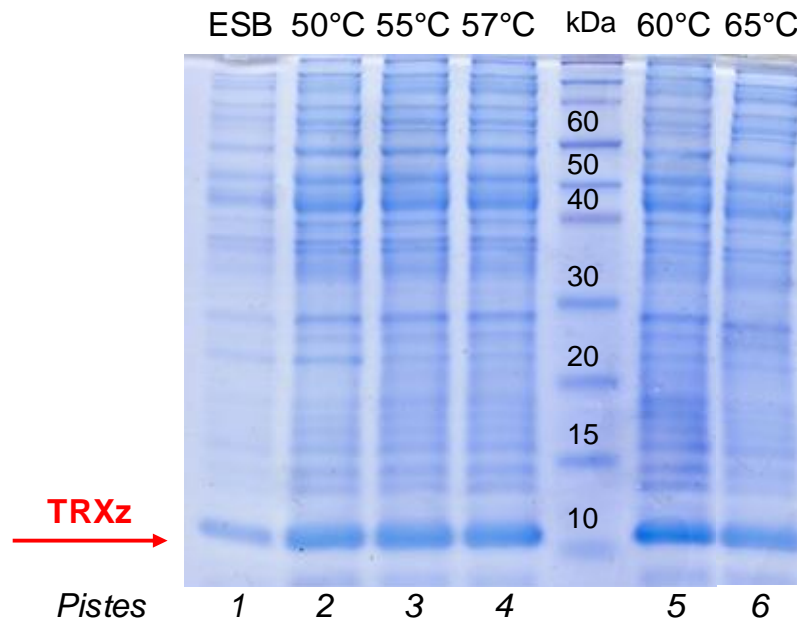


Figure 38 : Test de thermostabilité de la TRX z recombinante.

L'extrait soluble brut (ESB) protéique est traité à différentes températures ; les échantillons sont ensuite analysés sur gel SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. L'extrait de protéines solubles est enrichi en TRX z après le traitement thermique, indiquant que la TRX z peut être considérée comme étant une protéine thermostable.

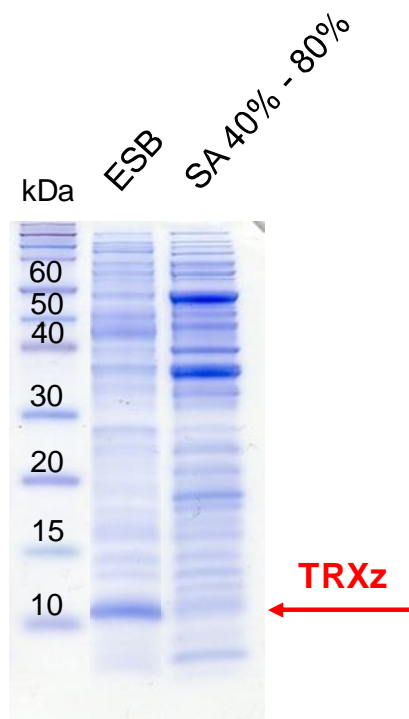


Figure 39 : Fractionnement au sulfate d'ammonium 40% - 80% de l'extrait protéique soluble.

Analyse sur gel SDS-PAGE de l'extrait protéique soluble brut (ESB) et de l'extrait protéique soluble ayant subi le fractionnement au sulfate d'ammonium (SA) 40% - 80%.

Les thiorédoxines étant des protéines dites thermostables (Laurent et al., 1964), cette propriété particulière a été utilisée pour enrichir l'extrait de protéines solubles totales en thiorédoxine recombinante en éliminant les protéines dites thermosensibles. La thermostabilité de la TRX z a été testée par plusieurs traitements thermiques (Figure 38) : quelle que soit la température à laquelle l'extrait de protéines solubles totales est soumis, la TRX z est toujours retrouvée dans la partie soluble de l'extrait protéique. Néanmoins, lorsque l'extrait de protéines solubles totales est traité à 60°C, il semble que l'enrichissement en TRX z soit meilleur (Figure 38, piste 5). De ce fait, l'étape de traitement thermique de l'extrait de protéines solubles totales est réalisée à 60°C.

La TRX z se comporte donc comme toutes les thiorédoxines qui sont thermostables, et peut donc être considérée comme étant une protéine thermostable.

L'enrichissement de l'extrait de protéines solubles se poursuit par une étape de fractionnement au sulfate d'ammonium. Cette étape repose sur le fait que le sulfate d'ammonium est un sel qui va progressivement remplacer les couches d'eau qui entourent les protéines, jusqu'à les rendre insolubles, entraînant ainsi leur précipitation. Plus la masse moléculaire des protéines est élevée, plus le pourcentage en sulfate d'ammonium nécessaire pour les faire précipiter est faible. Dans le cas de la purification d'une thiorédoxine, il est commun de réaliser un fractionnement au sulfate d'ammonium de 40% - 80% (Stein et al., 1995; Collin et al., 2003; Lemaire et al., 2003; Collin et al., 2004). Les protéines de masse moléculaire élevée sont précipitées en premier (0% - 40%), les thiorédoxines (12 kDa) se trouvent quant à elles dans la fraction traitée avec 80% de sulfate d'ammonium (fraction 40% - 80%), permettant ainsi l'enrichissement de l'extrait protéique soluble en thiorédoxine recombinante. Cependant, lors de l'étape d'enrichissement de l'extrait en TRX z par le fractionnement au sulfate d'ammonium, la précipitation par 80% de sulfate d'ammonium a causé une grande perte de protéine recombinante (Figure 39). De façon surprenante, l'extrait final récolté n'est ainsi pas enrichi mais appauvri en TRX z recombinante. Le comportement atypique de cette thiorédoxine lors de l'étape d'enrichissement nous a alors fait reconsidérer cette étape.

L'extrait de TRX z recombinante obtenu après le fractionnement au sulfate d'ammonium 40% - 80% a ensuite été purifié par une chromatographie d'affinité sur colonne échangeuse d'anions (DEAE-Sephacel, résine chargée positivement) qui consiste à séparer les protéines

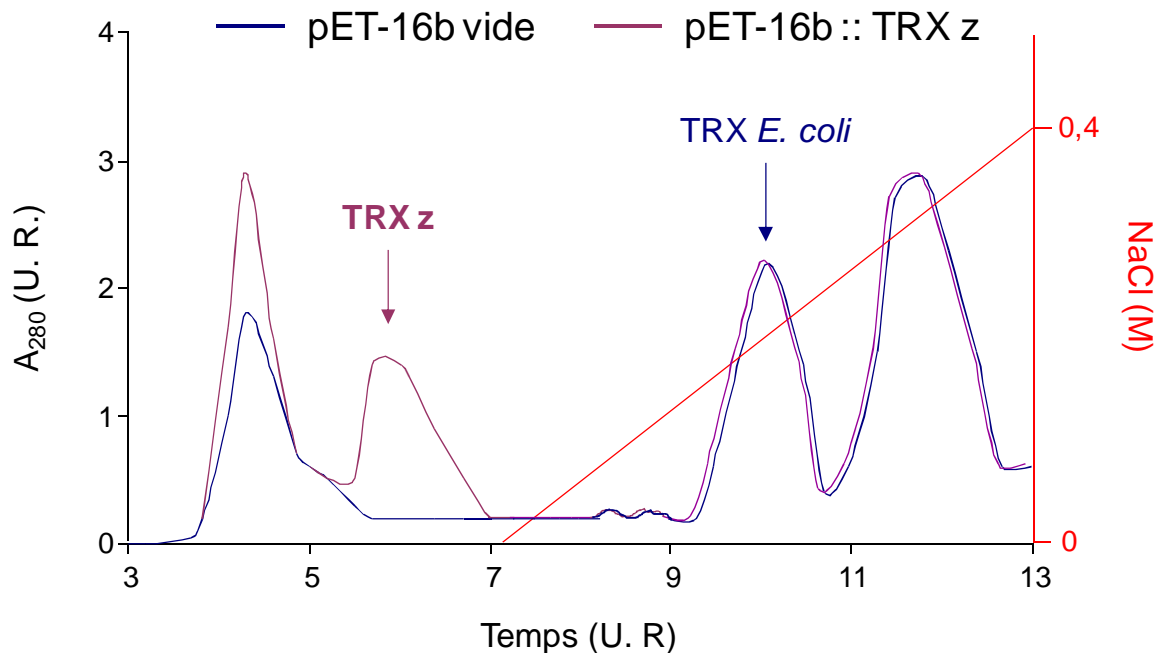


Figure 40 : Profil d'élution de la TRX z recombinante d'Arabidopsis et de la TRX d'Escherichia coli lors de la chromatographie d'affinité sur colonne échangeuse d'anions DEAE-Sephacel.

La TRX z recombinante d'Arabidopsis ne s'accroche pas à la résine de la colonne et se trouve ainsi dans la fraction appelée « passed through » tandis que la TRX d'E. coli est éluée lors du gradient linéaire en NaCl à une concentration de 0,2 – 0,3 M.

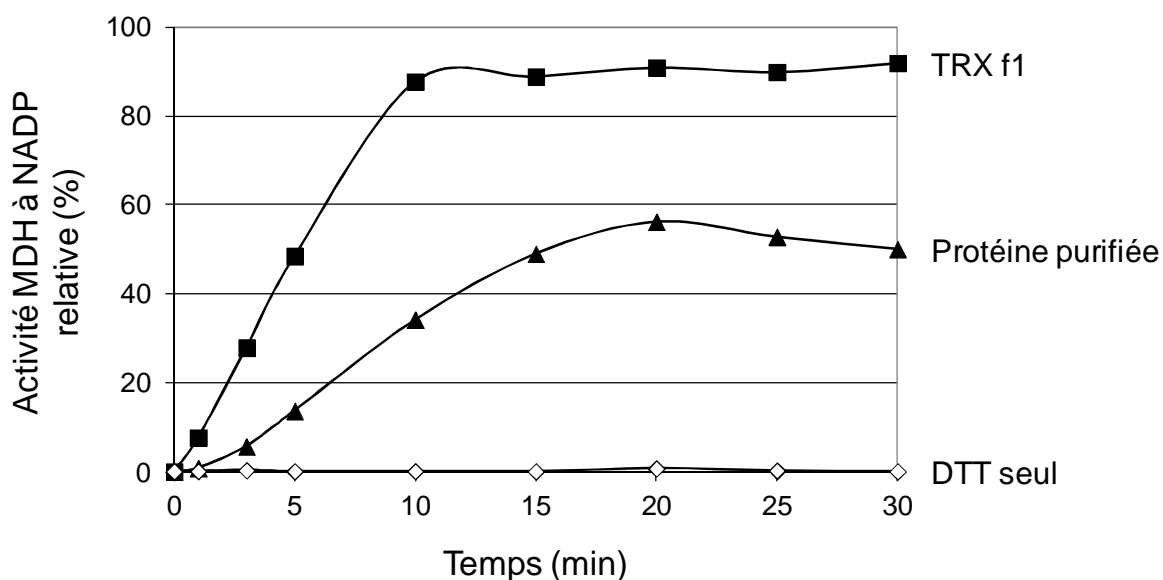


Figure 41 : Test d'activité MDH à NADP en présence de la protéine recombinante purifiée.

L'activation de la MDH à NADP a été mesurée en présence de DTT seul (contrôle négatif), de TRX f1 d'Arabidopsis (témoin positif) et de la protéine purifiée.

en fonction de leur charge de surface globale. Cette étape nous a permis alors de séparer efficacement la TRX z recombinante de la thiorédoxine endogène d'*E. coli* : en effet, la TRX z n'est pas retenue par la résine, se retrouvant ainsi dans la fraction du « passed through » tandis que la TRX d'*E. coli* n'est éluée qu'à une concentration en NaCl de 0,3 M (Figure 40). Pour terminer la purification de la TRX z recombinante, une étape finale sur tamis moléculaire a été réalisée (Sephadex-G50, < 30kDa) afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Dans le but de suivre la TRX z recombinante dans l'extrait protéique pour ces deux étapes de chromatographie, le test d'activation de la MDH à NADP a été utilisé, la TRX z pouvant potentiellement activer cette enzyme. Effectivement, nous avons pu alors observer que les fractions d'élution récoltées à la suite de la chromatographie échangeuse d'anion (DEAE) et de la chromatographie d'exclusion (G50) activaient bien la MDH à NADP (Figure 41).

Dans la mesure où l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium a engendré une perte importante de TRX z recombinante, le rendement final de purification était très faible (0,4 mg de protéine purifiée par litre de culture bactérienne d'*E. coli*).

Afin de valider l'identité de la protéine, une fraction de protéine recombinante purifiée a été analysée par spectrométrie de masse, en collaboration avec Paulette Decottignies (IBBMC, Orsay). Étonnamment, il s'est avéré que la protéine purifiée n'était pas la TRX z mais la TRX d'*E. coli*. Ainsi, l'activation de la MDH à NADP observée en présence de protéine recombinante purifiée n'est pas due à la TRX z mais à la TRX d'*E. coli*.

Une nouvelle production/purification de la TRX z a alors été réalisée, des analyses en spectrométrie de masse ayant été faites à chaque étape de la production et de la purification afin de confirmer qu'il s'agissait bien de la TRX z recombinante dans l'extrait.

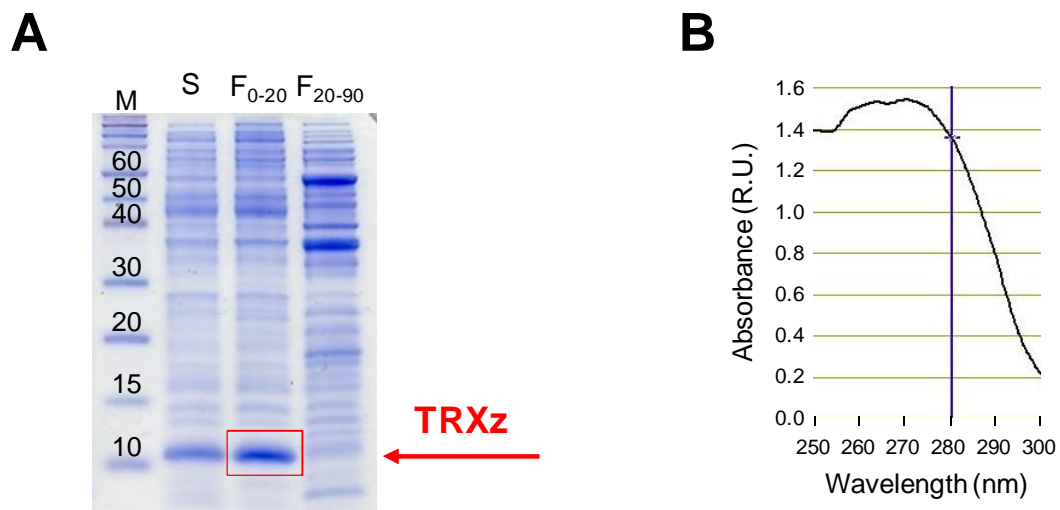


Figure 42 : Fractionnement au sulfate d'ammonium 20%-90% de l'extrait protéique soluble.
A, Analyse sur gel SDS-PAGE de l'extrait de protéine soluble totales (S) et des fractions traitées au sulfate d'ammonium (0-20% et 20%-90%) ; B, spectre d'absorption de la fraction F0-20 traitée avec 20 % de sulfate d'ammonium.

B. Optimisation du protocole de production et purification pour la TRX z recombinante

1) Production de la TRX z, thermostabilité et fractionnement au sulfate d'ammonium

La production de la TRX z recombinante et le traitement thermique de l'extrait de protéines solubles totales extraites se déroulent comme précédemment décrit.

Parallèlement au travail présenté précédemment, en 2010, il a été montré que la TRX z est une sous-unité du complexe de l'ARN polymérase plastidiale (« Plastid-encoded RNA Polymerase », PEP), complexe protéique responsable de l'activité ARN polymérase majoritaire dans le chloroplaste mature et dont la masse moléculaire dépasse les 1000 kDa (Schröter et al., 2010). La TRX z a ainsi été identifiée comme étant une protéine associée au complexe PEP (« PEP-associated protein », PAP), dont la mutation est responsable d'un phénotype albinos très marqué (Arsova et al., 2010; Meng et al., 2010; Schröter et al., 2010; Steiner et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que les protéines qui interagissent avec les acides nucléiques ou avec des protéines de masse moléculaire élevée précipitent à une faible concentration en sulfate d'ammonium (0-20%) du fait qu'elles appartiennent à un complexe protéique de masse moléculaire élevée (Ehn et al., 2001).

De ce fait, dans le but de suivre la TRX z recombinante, l'extrait de protéines thermostables a été fractionné au sulfate d'ammonium 20% - 90%. La fraction traitée avec 20% de sulfate d'ammonium (F_{0-20}) est enrichie en TRX z recombinante (Figure 42 A), dont l'identité a été confirmée par spectrométrie de masse, tandis que la fraction traitée avec 90% de sulfate d'ammonium (F_{20-90}) est dépourvue de TRX z et mais contient bien la TRX d'*E. coli*. De plus, une analyse du spectre d'absorption à 260 nm a mis en évidence que la fraction F_{0-20} est fortement contaminée en acides nucléiques (Figure 42 B). Bien que le comportement de la TRX z soit très inhabituel pour une protéine de faible masse moléculaire (12 kDa), cette propriété particulière de la TRX z de précipiter à une faible concentration en sulfate d'ammonium (20%) suggère ainsi que la TRX z recombinante interagit fortement avec les acides nucléique et/ou d'autres protéines chez *Escherichia coli* également. Néanmoins, ce comportement de la TRX z lors du fractionnement au sulfate d'ammonium représente un

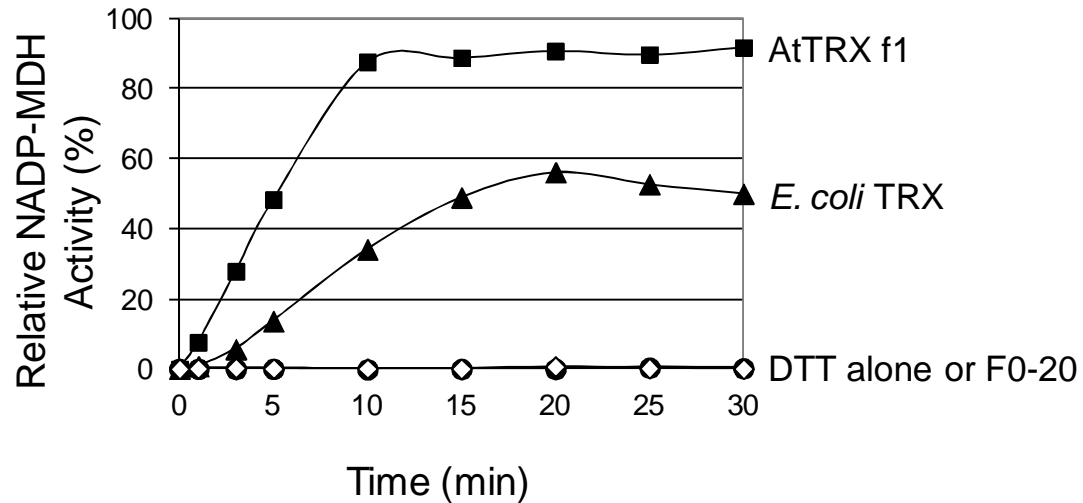


Figure 43 : Test d'activité de la MDH à NADP en présence de AtTRX f1, de la TRX d'E. coli et de la fraction F0-20 issue de l'étape de traitement au sulfate d'ammonium.

L'activation de la MDH à NADP a été testée en présence de 10 μ M de TRX f1 (carré noirs, témoin positif) ou de TRX d'E. coli (triangles noirs), en présence de la fraction F0-20 obtenue lors du fractionnement au sulfate d'ammonium et enrichie en TRX z (ronds noirs) ou de DTT seul (losanges blancs, contrôle négatif).

grand avantage ici puisque cela permet de séparer la TRX z recombinante de la TRX endogène d'*E. coli*, cette dernière précipitant bien à une concentration en sulfate d'ammonium de 90% (Figure 42 A).

Ce n'est pas la première fois qu'une telle caractéristique est mise en évidence pour une thiorédoxine : il a en effet été montré que la TRX d'*E. coli* est une sous-unité de l'ADN polymérase du bactériophage T7 (Mark and Richardson, 1976). Cependant, cela n'a jamais été mis en évidence pour une thiorédoxine d'organisme eucaryote.

Afin de valider que la fraction enrichie en TRX z recombinante n'est pas contaminée par la TRX d'*E. coli*, le test d'activation par réduction de la MDH à NADP a été réalisé.

2) Test d'activation de la MDH à NADP

La MDH à NADP est une enzyme du cycle de Calvin qui catalyse la réduction de l'oxaloacétate en malate en utilisant le NADPH comme cofacteur. La MDH à NADP est une enzyme cible connue des thiorédoxines. Cette enzyme est inactive lorsqu'elle est oxydée mais peut être activée en présence de thiorédoxines plastidiales réduites (Collin et al., 2003).

La Figure 43 confirme que la MDH à NADP est effectivement activée par la TRX f1 d'*Arabidopsis* (AtTRX f1, témoin positif ; Collin et al., 2003) et, avec une efficacité moindre, par la TRX d'*E. coli*. Néanmoins, lorsque ce test d'activation est réalisé en utilisant la fraction F₀₋₂₀, obtenue lors de l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium et enrichie en TRX z, aucune activation de la MDH à NADP n'est détectée. Cela indique donc que, bien que la fraction F₀₋₂₀ soit enrichie en TRX z recombinante, cette thiorédoxine est incapable d'activer la MDH à NADP. Cela permet de conclure également que la fraction F₀₋₂₀ ne contient plus de TRX endogène d'*E. coli*, ce qui a par ailleurs été confirmé par une analyse en spectrométrie de masse. La purification de la protéine recombinante peut ainsi continuer.

3) Purification de la TRX z par chromatographie d'exclusion

Classiquement, pour les thiorédoxines plastidiales, la fraction récoltée après le fractionnement au sulfate d'ammonium 40% - 80%, enrichie en thiorédoxine recombinante, est soumise à une purification par chromatographie d'affinité sur colonne échangeuse

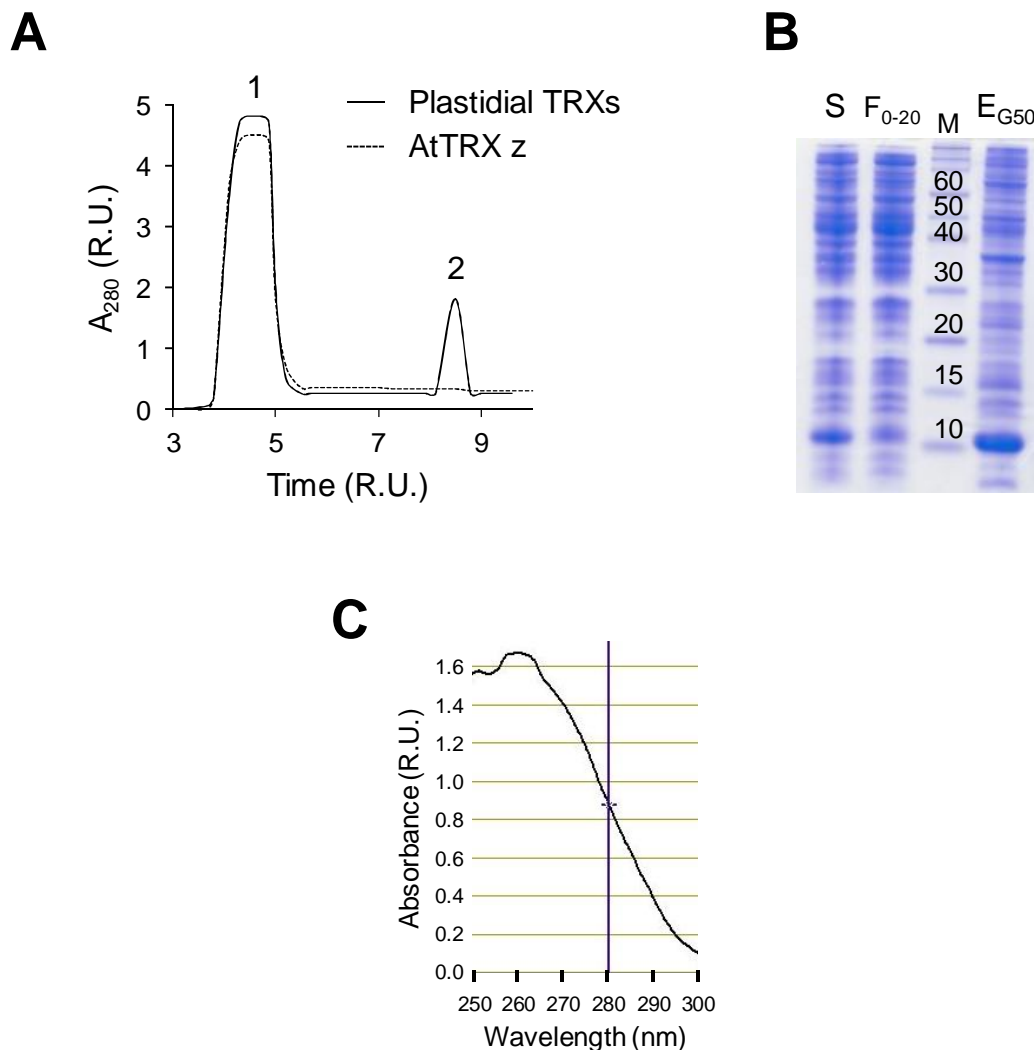


Figure 44 : Analyse de l'extrait protéique après l'étape de chromatographie d'exclusion.

A, Profil d'élution des thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis* au cours de la chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G-50 (< 30 kDa) : les fractions d'élution des protéines de haut poids moléculaire (1) et des thiorédoxines (2) sont indiquées ; B, L'extrait de protéines solubles totales (S), la fraction traitée au sulfate d'ammonium 20% (F₀₋₂₀) et la fraction d'élution récoltée lors de la chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G-50 (E_{G50}) ont été analysées par SDS-PAGE et les protéines colorées au bleu de Coomassie (25 µg de protéines). Le marqueur de masse moléculaire (M) est en kDa ; C, Spectre d'absorption de la fraction d'élution récoltée lors de la chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G-50.

d'anions (DEAE-Sephacel) (Stein et al., 1995; Collin et al., 2003; Collin et al., 2004). Le but de cette étape de purification est notamment de dissocier la thiorédoxine recombinante d'intérêt de la TRX endogène d'*E. coli* (Laurent et al., 1964; Moore et al., 1964).

Dans la mesure où l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium de l'extrait protéique total a permis de séparer la TRX z recombinante de la TRX d'*E. coli*, la fraction F₀₋₂₀ a été directement soumise à l'étape de chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G-50 (< 30 kDa). Le principe ici est de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, les protéines de masse moléculaire élevée étant éluées en premier. La Figure 44 A résume de profil d'élution de la TRX z ainsi que celui des autres thiorédoxines plastidiales lors d'une telle chromatographie. En effet, lors de la purification d'une thiorédoxine plastidiale, un premier pic d'élution, correspondant aux protéines de masse moléculaire élevée, est enregistré. Un deuxième pic d'élution est ensuite visualisé et correspond à la fraction de protéines de faible masse moléculaire dans laquelle la thiorédoxine recombinante est majoritaire (Figure 44 A).

Lors de la purification de la TRX z, le deuxième pic d'élution n'est pas visualisé, ce qui indique que la TRX z (12 kDa) est probablement éluée avec les protéines de masse moléculaire élevée. L'analyse de cette fraction d'élution sur gel SDS-PAGE (Figure 44 B, E_{G50}) révèle effectivement que la TRX z recombinante est présente dans cette fraction. Cela indique que la TRX z n'a pas été séparée des protéines de masse moléculaire élevée contenues dans l'extrait. Malgré l'ajout d'une concentration en sel importante (0,2 M NaCl), la séparation de la TRX z de ces autres protéines n'a jamais été efficace. Cela suggère donc que la TRX z interagit fortement avec ces protéines, ou certaines de ces protéines. Par ailleurs, la fraction éluée (E_{G50}) est une nouvelle fois fortement contaminée par des acides nucléiques comme le montre le spectre d'absorption à 260 nm (Figure 44 C).

De nouveau, cela souligne le fait que, lors de cette étape de purification par chromatographie d'exclusion, la TRX z ne se comporte pas comme une protéine de faible masse moléculaire (12 kDa). Cela renforce la possibilité que la TRX z ait la capacité d'interagir facilement et fortement (liaisons électrostatiques et/ou hydrophobes) avec des protéines pour former un complexe de masse moléculaire élevée qui se lie aux acides nucléiques. Ce comportement est d'ailleurs en totale adéquation avec ce qui a été observé lors de l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium.

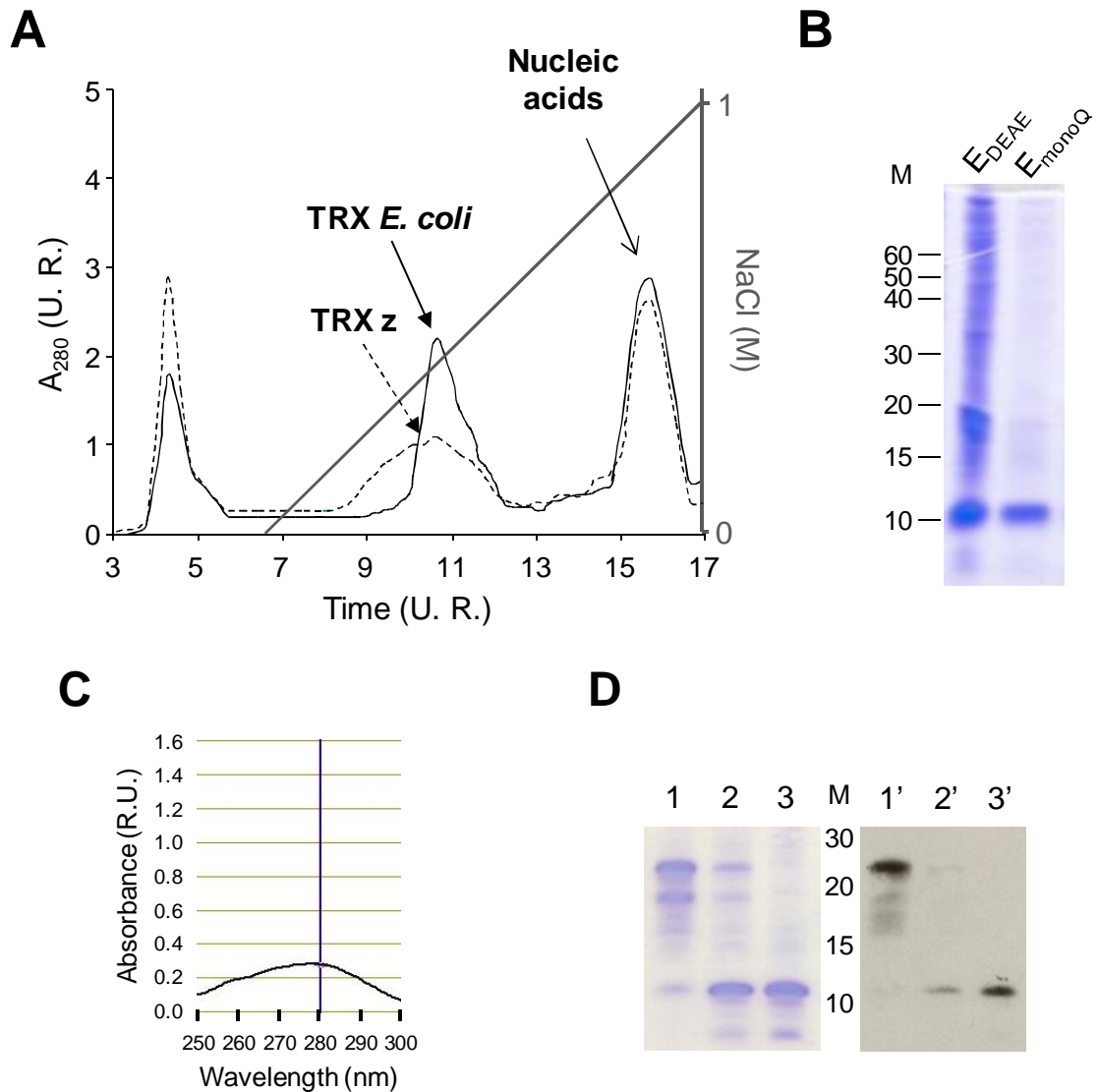


Figure 45 : Analyse des fractions d'élution récoltées après les étapes de chromatographie sur colonnes échangeuse d'anions.

A, Les fractions d'élution récoltées lors de la chromatographie d'affinité sur colonne DEAE-Sephacel (E_{DEAE} , 25 μ g de protéines) et sur colonne mono-Q HR 5/5 (E_{monoQ} , 5 μ g de protéines) ont été analysées par SDS-PAGE et les protéines colorées au bleu de Coomassie ; B, Spectre d'absorption de la fraction d'élution récoltée lors de la chromatographie d'affinité sur colonne DEAE-Sephacel ; C, Fraction d'élution récoltée lors de la chromatographie d'affinité sur colonne mono-Q HR 5/5 (lignes 1 et 1'), traitée avec 10 mM (lignes 2 et 2') ou 100 mM (lignes 3 et 3') de DTT (1,5 μ g de protéine). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. L'analyse par Western blot a été réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique de la TRX z (lignes 1' à 3') afin d'en confirmer l'identité. Le marqueur de masse moléculaire (M) est en kDa.

4) Purification de la TRX z par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

Du fait de la présence de nombreux contaminants associés à la TRX z dans la fraction d'élution récoltée lors de la chromatographie d'exclusion (G-50), cette fraction a été soumise à une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions DEAE-Sephacel. Le but de cette étape de purification supplémentaire est d'aboutir à la purification de la TRX z et également d'éliminer les acides nucléiques présents en grande quantité dans la fraction. En effet, du fait de la charge positive de la résine, les acides nucléiques sont efficacement retenus et ne sont élués qu'à des concentrations en sel élevées.

La TRX z est éluee au cours d'un gradient linéaire en sel (0 à 1 M de NaCl) à une concentration de 0,3–0,4 M. Il est à noter que la TRX endogène d'*E. coli* se comporte de façon semblable lors d'une telle chromatographie et est éluee à une concentration en NaCl proche (Figure 45 A). Il est donc très avantageux que la TRX z soit séparée de cette dernière dès l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium.

Cependant, l'analyse sur gel SDS-PAGE de la fraction d'élution récoltée (E_{DEAE}) indique que celle-ci est enrichie en TRX z mais reste contaminée par d'autres protéines (Figure 45 B). Néanmoins, cette étape de chromatographie a permis d'éliminer les acides nucléiques, élués à une concentration en NaCl de l'ordre du molaire (Figure 45 A), ce qui a été confirmé par l'analyse du spectre d'absorption : l'extrait protéique récolté est bien dépourvu d'acides nucléiques (Figure 45 C).

Du fait de la présence de protéines contaminantes dans la fraction d'élution en sortie de colonne DEAE-Sephacel, une étape supplémentaire de chromatographie échangeuse d'anions sur colonne mono-Q HR 5/5 a été réalisée. L'utilisation de cette colonne, hautement résolutive, est tout à fait indiquée ici pour finaliser la purification de la TRX z recombinante.

Préalablement à la purification, la fraction d'élution E_{DEAE} est traitée pendant 20 minutes par 20 mM de DTT_{red} à température ambiante. Lors de la purification sur colonne mono-Q, la protéine est éluee par un gradient linéaire de NaCl, une concentration de 700 mM étant nécessaire pour permettre l'élution de la TRX z recombinante. Comparé à ce qui est observé lors de la purification de thiorédoxines recombinantes telles que les TRX m1 et m3 d'*Arabidopsis* (Tableau 10), la concentration en sel requise pour l'élution de la TRX z est plus

Thioredoxin type	Organism	NaCl elution (mM)	Acidic amino acids (%)	Basic amino acids (%)
Native TRX h	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	20	12,5%	10,7%
Native TRX m	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40	13,2%	11,3%
Recombinant TRX m1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80	12,5%	8,9%
Native TRX	<i>Escherichia coli</i>	160	14,8%	10,2%
Recombinant TRX m3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	160	16,2%	10,5%
Recombinant TRX z	<i>Arabidopsis thaliana</i>	700	18,5%	8,3%

Tableau 10 : Profils d'élution de diverses thiorédoxines sur colonne mono-Q HR 5/5 (Paulette Decottignies, communication personnelle).

Les concentrations en NaCl (mM) requises pour l'élution des thiorédoxines de divers organismes au cours de la purification sur colonne mono-Q HR 5/5 ainsi que la composition (%) en acides aminés acides et basiques de la séquence primaire de ces protéines sont indiquées.

élevée (700 mM contre 80mM et 160 mM pour les TRX m1 et m3 respectivement). Cependant, la TRX m3 recombinante d'*Arabidopsis* est éluée à une concentration en sel identique à ce qui est observé pour l'élution de la thiorédoxine native, c'est-à-dire non recombinante, d'*E. coli* (160 mM). La concentration requise pour l'élution de la TRX d'*E. coli* sur la colonne Mono-Q est, cependant, plus importante que ce qui est requis pour l'élution des TRX h et m natives de *Chlamydomonas reinhardtii* (20 mM et 40 mM respectivement).

Il semble que la concentration en NaCl nécessaire à l'élution d'une protéine lors de la purification sur colonne mono-Q soit liée à la composition en acides aminés de la protéine considérée. En effet, la TRX z possède une proportion d'acides aminés acides (18,5%) plus élevée que ce qui est observé pour les autres thiorédoxines, recombinantes et natives, précédemment citées (12,5 à 16,2%) (Tableau 10). Il semble donc que la TRX z présente une surface de charge négative plus importante, ce qui est en accord avec la distribution des charges de surface globale prédite pour la TRX z (König et al., 2012). En effet, la TRX z, présente une charge de surface globale très négative, ce qui lui confère la capacité de se lier très fortement aux groupements NH_4^+ de la résine mono-Q. Cela justifie donc qu'une concentration en sel élevée soit nécessaire pour permettre l'élution de la TRX z recombinante.

Finalement, lors de cette ultime étape de chromatographie sur colonne échangeuse d'anions mono-Q, la TRX z recombinante a pu être purifiée à homogénéité (Figure 45 B, E_{monoQ}). Afin de confirmer l'identité de la TRX z ainsi que l'état de pureté de la préparation, une analyse en spectrométrie de masse ainsi qu'une analyse par un Western blot à l'aide d'un anticorps spécifique anti-TRX z ont été réalisées (Figure 45 D).

Étonnamment, le signal identifié par Western blot correspondait à une protéine de 25 kDa environ (Figure 45 D, lignes 1 et 1') et non à une protéine dont la masse attendue est de 12 kDa comme observé en Figure 45 B. Cependant, lorsque la protéine purifiée est traitée avec 10 mM ou 100 mM de DTT_{red} (lignes 2 et 2' et 3 et 3' respectivement), il apparaît que le signal à 25 kDa disparaît progressivement au profit de l'apparition d'un signal à 12 kDa. Cela suggère donc que, lorsqu'elle est oxydée, la TRX z est principalement sous forme de dimères mais, lors de sa réduction chimique, elle se monomérise. De plus, la dimérisation de la TRX z semble se produire rapidement. Le phénomène de dimérisation d'une thiorédoxine a été observé auparavant pour la TRX f1 qui, en plus des deux résidus cystéine de son site actif,

Purification step	Total protein (mg)	TRX z (%)
Soluble protein extract	268.8	15
Thermostable protein extract	98.5	
0-20% ammonium sulfate-treated fraction (F0-20)	50.5	40
Sephadex G-50 column	40.4	40
Sephacel-DEAE column	28.2	55
mono-Q HR5/5 HPLC column	1.3	100

Tableau 11 : Purification de la protéine TRX z recombinante d'*Arabidopsis thaliana* à partir d'un litre de culture bactérienne d'*E. coli*.

comprend un troisième résidu cystéine dans sa séquence mature, ce troisième résidu étant impliqué et responsable de la dimérisation de la TRX f1 (Michelet et al., 2005). Il est à noter cependant que la forme maturée (Lys79) de la TRX z ne contient aucun autre résidu cystéine que les deux présents dans le site actif de la protéine. La dimérisation de la TRX z semble donc être liée à ses propriétés intrinsèques.

La TRX z recombinante non étiquetée a ainsi pu être purifiée à homogénéité, 1,3 mg de protéine purifiée ayant été obtenus à partir d'un litre de culture bactérienne d'*E. coli* (Tableau 11). Néanmoins, lorsque l'on compare le rendement de purification de la TRX z recombinante aux rendements de purification obtenus, en utilisant le protocole classique de purification, de la TRX m (5 mg de protéine purifiée/litre de culture) ou de la TRX h (60 mg de protéine purifiée/litre de culture) de *Chlamydomonas reinhardtii* (Stein et al., 1995), ou à celui de la TRX f de Pois (6 mg de protéine purifiée/litre de culture, Hodges et al., 1994), il apparaît que le rendement de purification de la TRX z recombinante d'*Arabidopsis* est bas. Ce rendement est par ailleurs trop faible pour envisager la caractérisation biochimique *in vitro* de la TRX z, étude au cours de laquelle une grande quantité de protéine recombinante est utilisée.

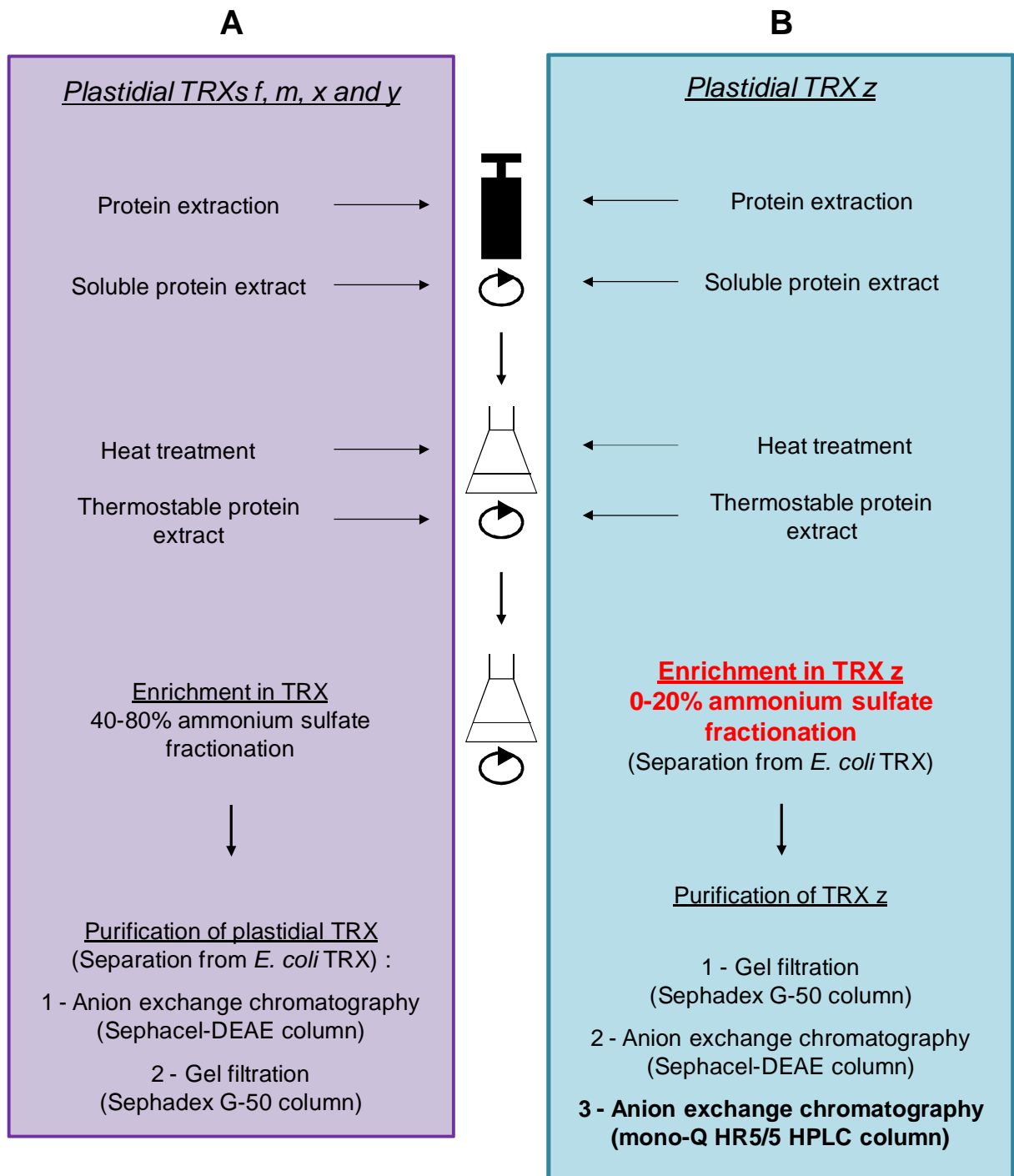


Figure 46 : A, Protocole classique de purification des TRX plastidiales de types *f*, *m*, *x* et *y* ; B, Protocole adapté et optimisé à la purification de la TRX *z* d'*Arabidopsis*.

De façon générale, le protocole de purification classiquement utilisé pour la purification de l'ensemble des autres thiorédoxines plastidiales (Figure 46 A) ne s'applique pas au cas de la TRX z et a été optimisé pour sa purification, en particulier au niveau des étapes d'enrichissement en TRX z recombinante lors du fractionnement au sulfate d'ammonium et lors des différentes étapes de purification successives. Cela a ainsi permis de mettre au point un protocole adapté à la purification de la TRX z en prenant en compte ses particularités d'interaction (Figure 46 B).

Ce travail d'optimisation du protocole de purification de la TRX z recombinante non étiquetée d'*Arabidopsis thaliana* sera très prochainement soumis pour publication dans la revue scientifique *Protein Expression and Purification*.

III. Étude de l'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z étiquetée selon son état redox.

A. Obtention de la TRX z recombinante étiquetée

Dans la mesure où la production et la purification de la TRX z recombinante non étiquetée ne permettait pas d'obtenir une quantité importante et suffisante de protéine purifiée pour entamer la caractérisation biochimique de la TRX z, à la fin de ma première année de thèse, une nouvelle stratégie a été adoptée. La protéine recombinante a ainsi été fusionnée à une étiquette afin de faciliter sa purification.

Par ailleurs, à cette époque, un nouvel outil a été développé au laboratoire: il s'agit du vecteur d'expression pGENI, un dérivé du vecteur pET-16b. Ce vecteur permet de fusionner en position C-terminale d'une protéine d'intérêt l'étiquette *Strep-tag II*. J'ai donc entamé le clonage de la forme maturée de la TRX z dans le vecteur pGENI, en phase avec l'étiquette *Strep-tag II*.

La production de la TRX z étiquetée se déroule de la même façon que pour la protéine non étiquetée (production induite par 300 μ M d'IPTG et réalisée à 30°C sur la nuit). La purification est nettement facilitée du fait de la présence du *Strep-tag*: en effet, la purification de la protéine recombinante, par chromatographie d'affinité, se fait en une seule étape et utilise directement l'extrait de protéines solubles totales extraites des bactéries (voir la section « Matériels & Méthodes » pour plus de détails). Ainsi, cette stratégie nous a permis d'obtenir la TRX z recombinante rapidement et en quantité importante (10 mg de protéine recombinante par litre de culture bactérienne), permettant ainsi de débiter sa caractérisation biochimique *in vitro*. Par ailleurs, un autre avantage de cette technologie est qu'il existe un anticorps commercial dirigé contre le *Strep-tag* et hautement spécifique de celui-ci.

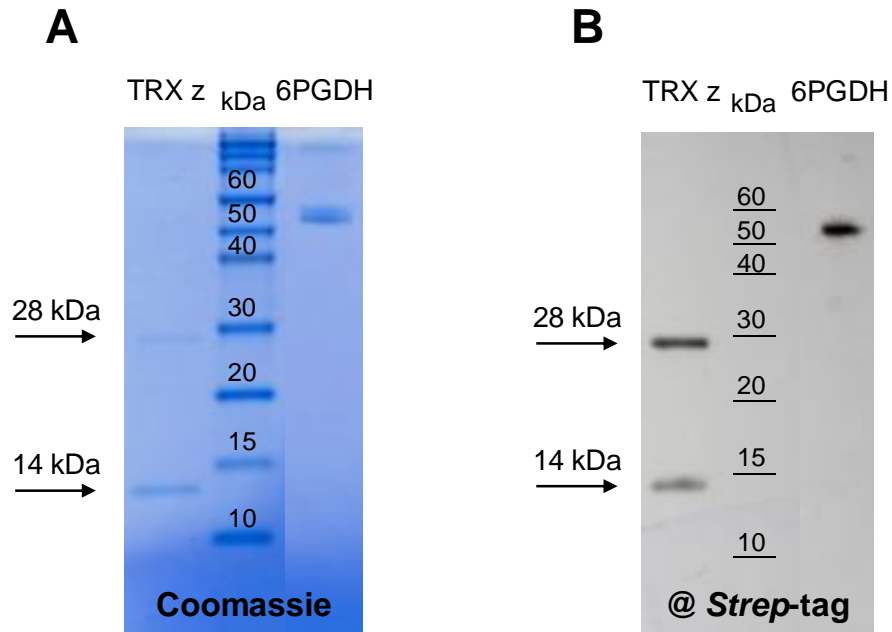


Figure 47 : Analyse de la purification de la TRX z recombinante étiquetée.

La pureté de la préparation de TRX z recombinante a été analysée sur gel SDS-PAGE et les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie (A) ou transférées sur membrane et analysées par Western blot en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le Strep-tag (B). La protéine recombinante 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH), fusionnée au Strep-tag, disponible au laboratoire a été utilisée comme témoin positif.

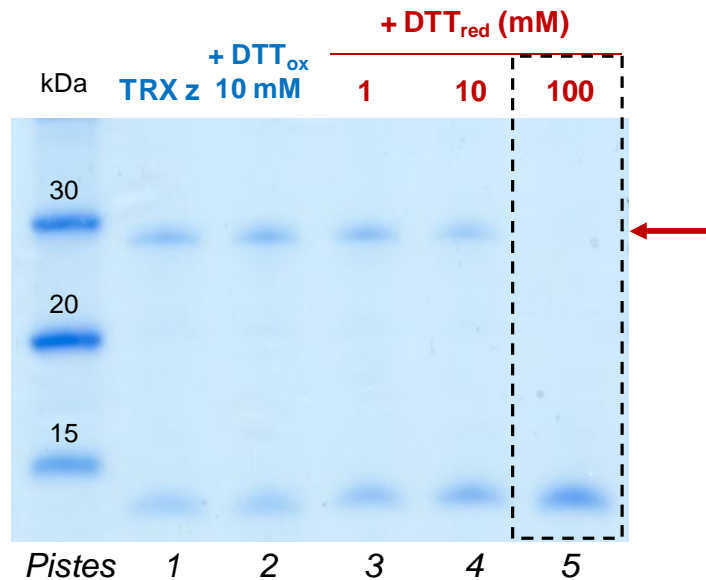


Figure 48 : Réduction chimique de la TRX z recombinante étiquetée.

L'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z recombinante (piste 1) est étudié lorsque la protéine est incubée en présence de DTT_{ox} 10 mM (piste 2) ou de concentrations variables en DTT_{red} (1 mM, piste 3 ; 10 mM, piste 4 et 100 mM, piste 5).

Lors de la purification de la TRX z étiquetée fusionnée au *Strep*-tag, l'état de purification de la préparation a été analysé sur gel SDS-PAGE. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie (Figure 47 A) et analysées par Western blot (Figure 47 B). La Figure 47 montre que la préparation de TRX z étiquetée est pure et que la détection par Western blot du *Strep*-tag est effectivement spécifique, ce qui est confirmé par l'utilisation d'un témoin positif, la protéine 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH) fusionnée au *Strep*-tag. La TRX z est bien à la masse attendue (14 kDa). Cependant, nous détectons également un signal à une masse supérieure (aux alentours de 28 kDa) qui pourrait correspondre à la forme dimérique de la TRX z.

Cette observation nous a conduits à étudier l'état de monomérisation et dimérisation de la TRX z afin de déterminer si cet état est corrélé à son état d'oxydoréduction.

B. Test de réduction chimique de la TRX z

La présence d'une forme dimérique potentielle de la TRX z nous a conduits à tester l'effet d'un oxydant fort, le trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane (DTT_{ox}) et d'un réducteur spécifique des thiols, le dithiothréitol (DTT_{red}), sur l'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z.

A l'état natif, la TRX z est présente sous forme de monomères et de dimères (Figure 48) piste 1). L'ajout d'un oxydant tel que le DTT_{ox} ne semble pas modifier l'état de dimérisation de la TRX z (Figure 48, piste 2).

D'autre part, l'ajout d'une concentration en DTT_{red} faible (1 mM) ne modifie pas la proportion de monomères/dimères de la TRX z (Figure 48, piste 3)/ toutefois, lorsqu'une concentration de 10 mM de DTT_{red} est utilisée, une sensible diminution de la proportion de dimères au profit de l'augmentation de la proportion de monomères de la TRX z est observée (Figure 48, piste 4). Il est important de noter qu'à cette concentration en DTT_{red} (10 mM), les autres thiorédoxines plastidiales sont réduites efficacement (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004). Ce n'est qu'en utilisant une concentration en DTT_{red} plus élevée (100 mM) que la forme dimérique de la TRX z disparaît totalement (Figure 48, piste 5). Cela indique que l'état dimérique de la TRX z semble sensible à son état de réduction.

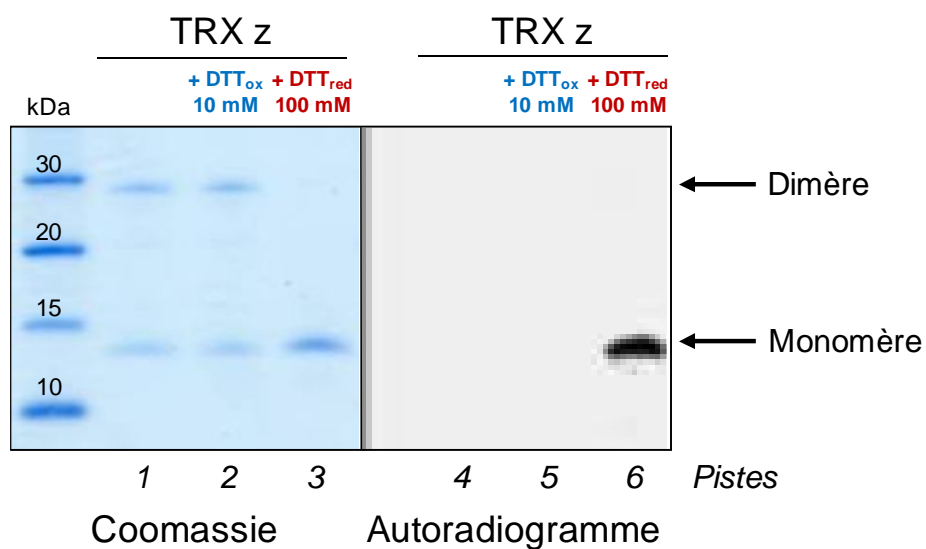


Figure 49 : Etude du statut redox de la TRX z par radiomarquage des thiols libres alkylés à l'IAM-¹⁴C.

La TRX z recombinante (pistes 1 et 4) est incubée en présence de 10 mM de DTT_{ox} (pistes 2 et 5) ou de 100 mM de DTT_{red} (pistes 3 et 6) puis est alkylée (IAM-¹⁴C). Son état d'oxydoréduction est révélé par autoradiographie (pistes 4 à 6).

Afin de valider cette hypothèse, une analyse par marquage à l'iodoacétamide radiomarké (IAM- ^{14}C) des groupements thiols libres accessibles (-SH) de la TRX z a été menée.

C. Étude de l'état d'oxydoréduction de la TRX z

Après traitement chimique au DTT_{ox} ou au DTT_{red}, les thiols libres accessibles de la TRX z ont été alkylés à l'iodoacétamide (IAM) radiomarké au carbone ^{14}C . Le but ici est de bloquer le statut redox de la TRX z juste après le traitement oxydant ou réducteur (effet de l'IAM) et de détecter par la suite l'état redox de la TRX z suite à ces traitements *via* la visualisation du radiomarquage (^{14}C).

Comme précédemment décrit, la TRX z recombinante est présente sous forme de monomères et de dimères. Après traitement à l'IAM- ^{14}C de la TRX z non traitée, aucun marquage des thiols, aussi bien au niveau du dimère qu'au niveau du monomère n'est observé (Figure 49, pistes 1 et 4). Cela indique donc que ni les dimères, ni les monomères de la TRX z recombinante non traités ne sont réduits. La même observation est faite lorsque la TRX z est traitée au DTT_{ox} (Figure 49, pistes 2 et 5) confirmant ainsi l'état d'oxydation des dimères et des monomères. Cependant, lorsque l'on traite la TRX z avec 100 mM DTT_{red}, concentration à laquelle la TRX z est entièrement monomérisée (Figure 49, piste 3), les monomères sont radiomarkés (Figure 49, piste 6), indiquant que les monomères de TRX z incubée avec 100 mM de DTT_{red} sont réduits.

Ces résultats indiquent clairement que lorsque la TRX z est réduite, elle se monomériser et que les monomères formés lors de la réduction des dimères sont à l'état réduit.

Le suivi de l'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z apparaît donc être un indicateur fiable de son état d'oxydoréduction.

Dans le but de confirmer les résultats obtenus *in vitro* concernant la dimérisation de la TRX z, une étude *in vivo* a été menée chez la levure *S. cerevisiae* lors d'un test binaire d'interaction (double hybride).

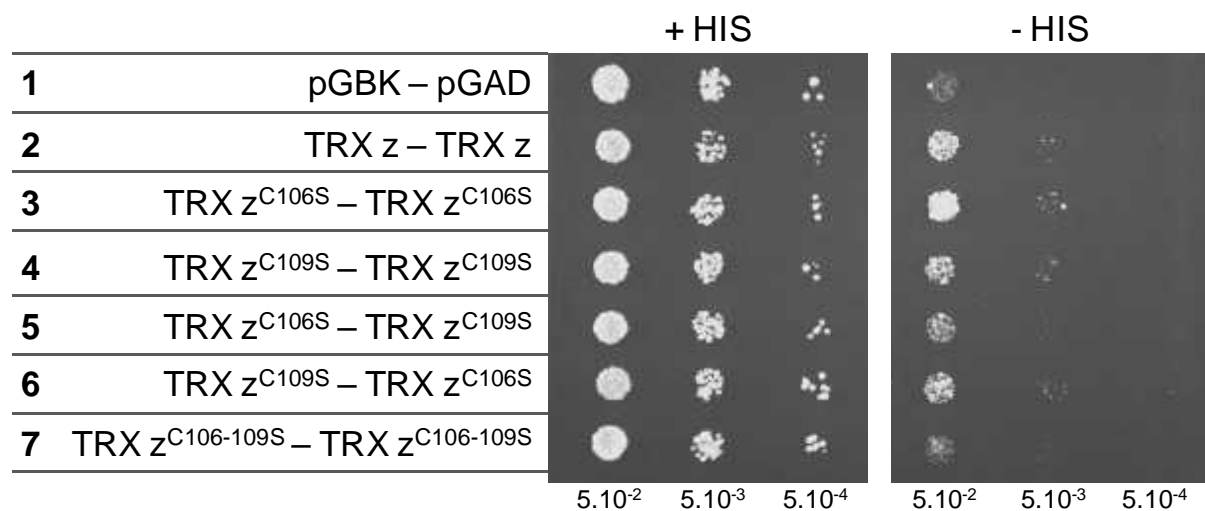


Figure 50 : Mise en évidence in vivo de la dimérisation de la TRX z chez la levure.

La souche CY306 est co-transformée avec les vecteurs pGAD et pGBK vides (ligne 1) ou les vecteurs pGAD :: TRX z et pGBK :: TRX z qui permettent la production des protéines de fusion AD_{Gal4} : TRX z et BD_{Gal4} : TRX z respectivement (ligne 2) ou ces même vecteurs qui permettent la production de protéines de fusion mutées sur un seul ou les deux résidus cystéine du site actif de la TRX z (TRX z^{C106S}, TRX z^{C109S} ou TRX z^{C106-109S}). Une série de dilution des cellules est déposée sur milieu gélosé contenant de l'histidine (+HIS) ou non (-HIS).

D. Étude de la dimérisation de la TRX z en système levure *in vivo*

La souche utilisée pour ce test est une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, dérivée de la souche commerciale YRG2, mutée sur les deux gènes codant les thiorédoxines cytosoliques endogènes (souche CY306, Vignols et al., 2005), ce qui permet d'éviter l'interaction entre la thiorédoxine d'intérêt (TRX z) et les thiorédoxines endogènes de la levure.

La souche CY306 est incapable de croître sur milieu dépourvu d'histidine (*his*⁻). Dans le cas de l'étude de la dimérisation de la TRX z, la souche a été transformée avec deux vecteurs complémentaires (pGAD et pGBK), chacun exprimant l'ADNc de la TRX z. Dans le cas où la TRX z se dimérise, la transcription du gène rapporteur *HIS3* permet de lever l'auxotrophie de la souche. Celle-ci est alors capable de croître sur un milieu dépourvu d'histidine (*-HIS*).

Sur milieu dépourvu d'histidine, on observe que la souche transformée avec les vecteurs exprimant les protéines TRX z sauvages non mutées est capable de croître (Figure 50, ligne 2) par comparaison à ce qui est observé pour la souche transformée avec les deux vecteurs d'expression pGBK et pGAD vides (Figure 50, ligne 1). Cela indique qu'il y a bien une interaction directe TRX z–TRX z et confirme que la TRX z est capable d'interagir avec elle-même et peut former un dimère *in vivo*.

Des formes mutées de la TRX z ont également été générées dans le but de déterminer si la mutation d'un ou des deux résidus cystéine du site actif influe sur l'état de dimérisation de la TRX z. Lorsque seul le premier ou le deuxième résidu cystéine du site actif (TRX z^{C106S} ou TRX z^{C109S}, respectivement) est muté sur chaque TRX z testée, la souche conserve sa capacité à croître sur milieu sélectif (Figure 50, lignes 3 et 4). Cela suggère donc que la dimérisation de la TRX z n'implique pas ces résidus lorsqu'ils sont mutés individuellement. De même, lorsque le premier résidu cystéine d'une TRX z (TRX z^{C106S}) et le deuxième résidu cystéine d'une autre TRX z (TRX z^{C109S}) sont mutés, la souche conserve sa capacité à croître sur milieu sélectif dépourvu d'histidine (Figure 50, lignes 5 et 6).

Enfin, lorsque les deux résidus cystéine de chaque partenaire sont mutés (TRX z^{C106-109S}), la croissance de la souche est bien affectée (Figure 50, ligne 7) et est équivalente à celle

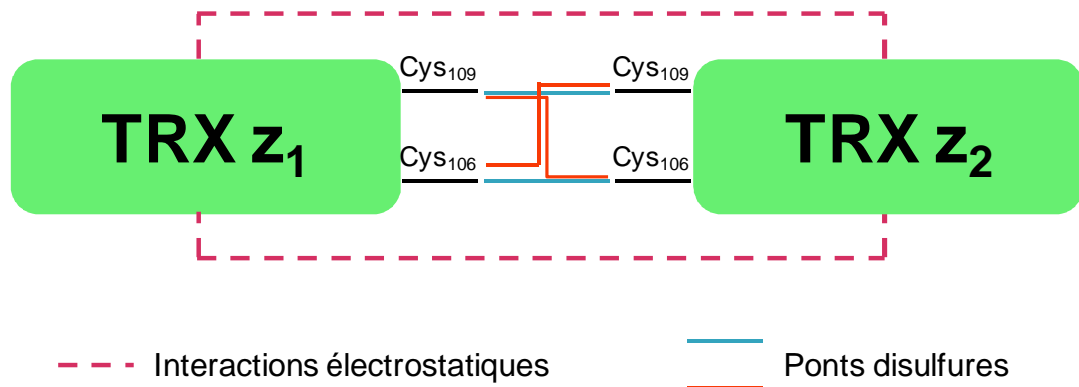


Figure 51: Proposition de modèle d'interaction entre deux TRX z aboutissant à la formation d'un dimère.

Dans un premier temps, les deux TRX z partenaires interagissent via des interactions électrostatiques. Par la suite, un ou deux ponts disulfures intermoléculaires impliquant un ou deux résidus cystéine de chaque partenaire se forment, permettant ainsi de stabiliser le dimère.

observée dans le cas de la transformation de la souche avec les deux vecteurs vides (pGBK–pGAD ; Figure 50, ligne 1). Cela montre ainsi que les deux résidus cystéine du site actif sont impliqués dans la dimérisation de la TRX z.

Ces résultats soulignent bien l'importance du rôle des deux résidus cystéine du site actif de la TRX z et leur implication dans sa dimérisation. Cependant, la mutation d'un seul résidu cystéine sur chaque partenaire n'affectant pas la croissance globale de la souche de levure, il est donc probable que la dimérisation de la TRX z ne soit pas uniquement dépendante de ces résidus. Ainsi, il est possible que, dans un premier temps, une première TRX z puisse former un dimère avec une deuxième TRX z *via* des liaisons électrostatiques, comme ce qui a pu être mis en évidence précédemment entre la TRX z et d'autres protéines. Dans un second temps, lorsque le dimère est formé, un ou deux ponts disulfures inter-moléculaires pourraient se former afin de stabiliser l'interaction TRX z–TRX z (Figure 51). Inversement, la formation d'un ou deux ponts disulfure inter-moléculaires pourrait permettre l'orientation des deux molécules de TRX z l'une par rapport à l'autre, de façon à favoriser leur interaction. Cette hypothèse justifie d'ailleurs que la TRX z soit si difficile à réduire chimiquement par le DTT_{red}.

IV. Capacité d'oxydoréductase et recherche du système de réduction de la TRX z

L'obtention de la TRX z recombinante étiquetée nous a par la suite permis de réaliser sa caractérisation biochimique. Plus particulièrement, nous avons testé sa capacité d'oxydoréductase de ponts disulfure sur des enzymes cibles connues des thiorédoxines plastidiales et avons recherché le système par lequel la TRX z oxydée peut être réduite.

A. Recherche du système de réduction de la TRX z

Lorsqu'une thiorédoxine est oxydée, elle doit être réduite à nouveau pour jouer son rôle dans la cellule. Dans le cytoplasme et les mitochondries, les thiorédoxines sont réduites par une réductase dont l'activité est dépendante du NADPH (NADPH-dependent thioredoxin reductase, NTR) (Jacquot et al., 1994; Laloï et al., 2001; Reichheld et al., 2005). Dans le chloroplaste, le système de réduction privilégié pour les thiorédoxines plastidiales est le système FTR (Ferredoxin-Thioredoxin Reductase), connu pour réduire efficacement à la lumière les TRX de type f et m (Droux et al., 1987a).

L'étude de la réduction des nouveaux types de thiorédoxines plastidiales (types x, y et z) n'a jusqu'à présent pas été révélée. Au cours de sa thèse, Vincent Massot a pu montrer expérimentalement que les TRX de types x et y sont effectivement réduites efficacement par le système FTR à la lumière.

La réduction de la TRX z par le système FTR à la lumière a pu être étudiée *via* le suivi de l'état de monomérisation/dimérisation de la TRX z, cet état reflétant son état d'oxydoréduction.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue scientifique *Journal of Experimental Botany*, parue en octobre 2012, intitulée « *New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin z from Arabidopsis* », dont le manuscrit est présenté ci-après.

Les données complémentaires relatives aux tests *in vitro* réalisés sur certaines cibles connues des thiorédoxines plastidiales suivent immédiatement le texte publié.

RESEARCH PAPER

New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin z from *Arabidopsis*

Anne-Sophie Bohrer^{1,*}, Vincent Massot^{1,*}, Gilles Innocenti¹, Jean-Philippe Reichheld², Emmanuelle Issakidis-Bourquet^{1,†} and Hélène Vanacker¹

¹ Institut de Biologie des Plantes, UMR CNRS 8618, Saclay Plant Sciences, Univ Paris-Sud, 91405, Orsay cedex, France

² Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Univ Perpignan, UMR CNRS 5096, 66860, Perpignan cedex, France

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: emmanuelle.issakidis-bourquet@u-psud.fr

Received 12 July 2012; Revised 12 September 2012; Accepted 20 September 2012

Abstract

In plants, thioredoxins (TRX) constitute a large protein disulphide oxidoreductase family comprising 10 plastidial members in *Arabidopsis thaliana* and subdivided in five types. The f- and m-types regulate enzymes involved mainly in carbon metabolism whereas the x, y, and z types have an antioxidant function. The reduction of TRXm and f in chloroplasts is performed in the light by ferredoxin:thioredoxin reductase (FTR) that uses photosynthetically reduced ferredoxin (Fd) as a reductant. The reduction system of *Arabidopsis* TRXx, y, and z has never been demonstrated. Recently, a gene encoding an atypical plastidial NADPH-dependent TRX reductase (NTRC) was found. In the present study, gene expression analysis revealed that both reductases are expressed in all organs of *Arabidopsis* and could potentially serve as electron donors to plastidial TRX. This ability was tested *in vitro* either with purified NTRC in presence of NADPH or with a light-driven reconstituted system comprising thylakoids and purified Fd and FTR. The results demonstrate that FTR reduces the x and y TRX isoforms but not the recently identified TRXz. Moreover, the results show that NTRC cannot be an efficient alternative reducing system, neither for TRXz nor for the other plastidial TRX. The data reveal that TRXf, m, x, and y, known as redox regulators in the chloroplast, have also the ability to reduce TRXz *in vitro*. Overall, the present study points out the unique properties of TRXz among plastidial TRX.

Key words: *Arabidopsis*, FTR, NTRC, plastid, redox signalling, thioredoxin.

Introduction

Thioredoxins (TRX) belong to a large multigenic family of oxidoreductases found in all free-living organisms. These small soluble proteins (12–14 kDa) share a characteristic fold, a conserved active site WCG/PPC sequence, and a low redox potential that confers on them strong reductive properties. The two cysteines of the active site are involved in thiol/disulphide exchanges with their target proteins.

The first plant thioredoxins (m- and f-types) were identified as regulators of chloroplastic enzymes related to carbon metabolism (Buchanan, 1980). Genomic revolution revealed

that plant TRX isoforms are encoded by multigene families (Meyer *et al.*, 2005; Nuruzzaman *et al.*, 2008). In *Arabidopsis thaliana*, 20 TRX isoforms are found, divided into three subgroups: cytosolic, mitochondrial, and plastidial. Sequence similarities and intron positions revealed that plastidial isoforms comprised nine members in *Arabidopsis*, subdivided into four types, f, m, x, and y (Mestres-Ortega and Meyer, 1999; Meyer *et al.*, 2005), with four isoforms in the m-type, two in the f-type, two in the y-type, and one in the x-type. Recently, two independent studies identified a tenth

plastidial thioredoxin, TRXz (Arsova *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2010).

This multiplicity of TRX isoforms raised the question of their redundancy or possible functional specialization. Complementation studies on a TRX-deficient yeast strain hypersensitive to oxidative stress showed that *Arabidopsis* TRXf, m, and x displayed different efficiencies (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001). Afterwards, biochemical *in vitro* studies revealed specificity of chloroplastic TRX towards their target enzymes. Indeed, TRXf and m redox regulate the activity of enzymes mainly involved in the primary metabolism, whereas the more recently identified isoforms x, y, and z can serve as hydrogen donors for antioxidant enzymes such as peroxiredoxins (PRX), suggesting their role in oxidative stress defence (Collin *et al.*, 2003, 2004; Lamkemeyer *et al.*, 2006; Née *et al.*, 2009; Chibani *et al.*, 2011). Moreover, recent proteomic studies revealed a multiplicity (nearly 100) of putative chloroplastic targets involved in a wide range of processes (Michelet *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2007; Vieira Dos Santos *et al.*, 2007; Valerio *et al.*, 2010). New putative TRX targets were also found in isolated organelles from wheat endosperm (Balmer *et al.*, 2006) and in *Arabidopsis* root extracts (Marchand *et al.*, 2010).

Once oxidized, TRX can be re-reduced by specific reductases. In the light, the photosynthetic electron transfer chain reduces ferredoxin (Fd) which can donate electrons to various enzymes including Fd:TRX reductase (FTR). This key enzyme of the Fd/TRX regulatory system has been shown to reduce efficiently TRXm and f in a reconstituted light activation system (Droux *et al.*, 1987). In the cytosol and mitochondria of plant cells, TRX are reduced by an NADPH-dependent TRX reductase (NTR) (Jacquot *et al.*, 1994; Laloi *et al.*, 2001; Reichheld *et al.*, 2005). A new gene encoding an atypical plastidial NTR (named NTRC) was identified in *Arabidopsis*, rice, and *Medicago truncatula* (Serrato *et al.*, 2004; Pérez-Ruiz *et al.*, 2006; Alkhalfioui *et al.*, 2007). It encodes a bipartite protein containing an NTR domain fused to a TRX domain. NTRC was shown to be an efficient redox system for chloroplast protection against oxidative damage and proposed as a possible alternative plastidial TRX-reducing system (Serrato *et al.*, 2004; Pérez-Ruiz *et al.*, 2006).

The recent finding of three new plastidial TRX types (x, y, and z) as well as the presence of plastidial TRX isoforms in non-photosynthetic organs (Collin *et al.*, 2004; Balmer *et al.*, 2006; Traverso *et al.*, 2008) raised the question of their reducing system(s). One can wonder whether NTRC can reduce plastidial TRX in non-photosynthetic tissues, or be a reducing system for the x, y, and z isoforms. A direct biochemical test can assess the ability of a given reductase to reduce a given TRX. However, the interaction is possible only if the two partners share the same spatial and temporal localization. Thus, in the present work, the expression patterns of the 10 genes encoding the plastidial TRX from *Arabidopsis* together with the four genes encoding the plastidial TRX reductase subunits were first examined using quantitative real-time PCR (qRT PCR). The gene expression profiles revealed that both FTR and NTRC could potentially serve as reductants for all TRX in plastids. This ability was tested directly *in vitro* using NTRC in presence of NADPH, or FTR in a light-driven reconstituted Fd/TRX system. Here it is demonstrated that FTR can reduce TRXx and y but not TRXz. Moreover, it is

shown that NTRC cannot be an alternative reducing system for plastidial TRX, but that reduced plastidial thioredoxins are able to reduce TRXz *in vitro*.

Materials and methods

Reagents

All biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Plant material

Arabidopsis thaliana wild-type (Columbia ecotype) were grown on soil in the greenhouse under natural growth conditions (20/18°C and 60/55% hygrometry, day/night, light intensity 80–100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and watered every 2 days.

Peas (*Pisum sativum* var. merveille de Kelvedon) were grown in the greenhouse on vermiculite, watered daily, and harvested 3 weeks after sowing.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA were isolated from 100 mg of frozen plant material (except for seeds: 30 mg) using the NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. For RNA extraction from dry seeds, 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone was added to the extraction buffer. The reverse transcription step was performed with up to 1 μg total RNA, using the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen) with oligo(dT) primer.

Quantitative real-time PCR analysis

Gene expression profiling was conducted by qRT PCR using gene-specific primer pairs and procedures detailed in [Supplementary Table S1](#) (available at *JXB* online).

Expression, production, and purification of recombinant proteins

Proteins and related purification procedures are described in [Supplementary Table S2](#).

2-Cys PRX activity assays

PRX activity was assayed in 30 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.9) with 20 μM 2-Cys PRXA from *Arabidopsis*, 400 μM DTT, 600 μM H_2O_2 , and 10 μM TRX. Remaining hydrogen peroxide was quantified colorimetrically at 560 nm using Peroxoquant reagent (Perbio Science). Alternatively, 2-Cys PRX activity was determined as oxidation of NADPH followed at 340 nm in a reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.2), 10 mM EDTA, 1 mM H_2O_2 , 10 μM PRX, 200 mM NTRC, and 150 μM NADPH.

Radiolabelling of SH groups in TRXz

A sample of TRXz preparation (60 μg) was alkylated with [^{14}C] iodoacetamide (0.5 MBq/ μmol , 2 mM), without treatment or after an oxidizing [*trans*-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane (DTTox), 10 mM, 15 min] or a reducing treatment [dithiotreitol (DTTred) 100 mM, 15 min]. After trichloroacetic acid precipitation and separation by SDS PAGE (Droux *et al.*, 1987), proteins were Coomassie blue stained and labelling was visualized by exposure of the dried gel to a low-energy imaging screen, for 2 weeks (Personal Molecular Imager FX System, BioRad).

Reduction of TRXx, y, and z by the Fd/FTR system

The reconstituted light activation system comprised, in a total volume of 50 μl , washed thylakoids equivalent to 10–20 μg chlorophyll,

prepared as described in Droux *et al.* (1987), 100 mM TRIS-HCl (pH 7.9), 2–5 μ M Fd, 10 μ M FTR, 25 μ M TRX, and 5 μ M subunit mutant NADP-malate dehydrogenase (MDH). Aliquots were withdrawn as a function of time of illumination ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$) and, for TRXx and y, tested for NADP-MDH activation level. For TRXz (NADP-MDH omitted), thiol redox status was estimated by redox Western blotting. Alternatively to the light-dependent system, 10 μ M TRXz was incubated for 15 min in the presence of 20 μ M NADPH, 40 nM ferredoxin:NADP reductase (FNR), 1 μ M FTR, and 1 μ M Fd according to Chibani *et al.* (2011). Free thiol groups were alkylated for 25 min, with 25 mM *N*-ethylmaleimide and 30 mM iodoacetic acid. Alkylated proteins were subjected to non-reducing SDS-PAGE and the reduction state of TRXz was evaluated from its monomer/dimer status by Western blot.

Chemical activation of NADP-malate dehydrogenase

Δ 15-NADP-MDH (shortened by 15 amino acids at the N-terminus) whose biochemical characteristics are identical to those of the full-length wild-type MDH (Johansson *et al.*, 1999) and mutant C207A/C365A/C377A-NADP-MDH (Ruelland *et al.*, 1997) were used. Enzymes (5 μ M) were incubated at room temperature, with 25 μ M TRX plus 1 mM DTT, or 5 or 100 μ M TRXz plus 100 mM DTT or DTT alone. The enzymatic activity was measured in 100 mM TRIS-HCl (pH 7.9), 180 μ M NADPH, and 750 μ M oxaloacetate. Disappearance of NADPH was followed spectrophotometrically at 340 nm.

Immunodetection of TRXz by Western blot

Samples were separated by non-reducing 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (iBlot Gel Transfer Device, Invitrogen). Detection was performed using either a commercial anti-Strep-tag II monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (Iba) at a dilution of 1:10,000 or a primary specific anti-TRXz antibody at a dilution of 1:2500 and a secondary horseradish peroxidase conjugated antibody at a dilution of 1:50,000, and revealed by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). The specificity of the anti-TRXz antibody was checked towards all the other plastidial TRX by Western blot (Supplementary Fig. S1).

Reduction of plastidial TRX by NTRC and NTRA tested spectrophotometrically

The ability of *Arabidopsis* cytosolic NADPH-dependent TRX reductase (NTRA) or plastidial NADPH-dependent TRX reductase (NTRC) to reduce TRX was measured by the 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Pierce) reduction assay. The reaction mixture (1 ml) contained 20 nM NTRC or NTRA, 150 μ M NADPH, 1 mM DNTB, and 10 μ M TRX in 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) and 1 mM EDTA. All measurements were carried out at 25°C by monitoring the increase in absorbance at 412 nm caused by the release of thionitrobenzoate (TNB⁻).

Reduction of TRXz by the GSH/GRX system, NTRC, or plastidial TRX

TRXz was pre-oxidized by 10 mM DTTox during 20 min. DTTox was removed on a PD Spin Trap G-25 column (GE Healthcare). Oxidized TRXz (10 μ M) was incubated for 20 min at room temperature with various reductants: either 1, 5, or 10 mM reduced glutathione (GSH) or 300 μ M NADPH, 6 μ g/ml baker's yeast glutathione reductase (GR), 5 mM GSH, and 10 μ M chloroplastic glutaredoxin GRXS16. NTRC (2 μ M) was tested with 500 μ M NADPH. Plastidial TRX (f1, m1, x, or y1; 10 μ M) were also tested in presence of 1 mM DTT. The redox state of TRXz was evaluated from its monomer/dimer status by redox Western blotting.

Results

Transcript levels reveal that both NTRC and FTR are expressed along with plastidial TRX, including in non-photosynthetic organs

Using qRT-PCR, the presence of mRNAs encoding plastidial TRX was detected in all organs of *Arabidopsis* at different levels depending on the isoform (Fig. 1A). Globally, genes encoding m-type TRX (except m3) and TRXx were more abundantly expressed, especially in leaves and young seedlings. Genes coding for TRXf1 and f2 and TRXy2, although expressed at a lower level, showed similar expression profiles. The gene coding for TRXz was expressed at the lowest level and its expression was restricted to leaves, flowers, and young siliques. Noteworthy, Attrxm3 and Attrxy1 expression patterns differed from those of other plastidial *Arabidopsis* trx genes, being predominantly expressed in non-photosynthetic tissues, e.g. mature siliques, roots, and dry seeds. As previously suggested (Collin *et al.*, 2004), the gene encoding TRXy1 is the most strongly expressed in seeds among all plastidial *Arabidopsis* TRX. Overall, these results are consistent with transcriptomic data obtained from the *Arabidopsis* eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efp-Web.cgi>, Supplementary Fig. S2).

The expression levels of the genes encoding the variable subunits FTRA1 and FTRA2 of FTR (Kerker *et al.*, 2004) were close to the one encoding NTRC (Fig. 1B). The gene encoding the catalytic FTRB subunit was expressed in all organs tested including non-photosynthetic organs. FTRB transcripts were quite abundant as compared to FTRA1 and FTRA2. Expression profiles of both genes encoding FTR variable subunits were more strongly expressed in leaves, young seedlings, and mature siliques. Similarly, ntrc showed a wide expression profile with a higher level in green tissues.

These findings prompted the testing of both FTR and NTRC in their ability to reduce plastidial TRX. TRXx and y have been characterized in our laboratory (Collin *et al.*, 2003, 2004) and showed specific antioxidant functions. However, their reduction system, as well as the one of *Arabidopsis* TRXz, was still unknown.

TRXz is a functional oxidoreductase with target specificities

Among the well-known TRX-dependent chloroplastic enzymes, NADP-MDH is probably the most studied enzyme (Ruelland and Miginiac-Maslow, 1999). It is devoid of activity in its oxidized state and is activated in presence of reduced TRXf or m, except m3 (Collin *et al.*, 2003). In the current study TRXz was expressed in its mature form (N-terminal transit peptide removed) in *Escherichia coli* as a Strep-tagged protein. It failed to activate wild-type sorghum NADP-MDH in the presence of DTT (data not shown).

Activation of NADP-MDH involves the reduction of two regulatory disulphides located in sequence extensions at the N- and C-terminus (Issakidis *et al.*, 1994). A mutant form of NADP-MDH where only the N-terminal disulphide remains

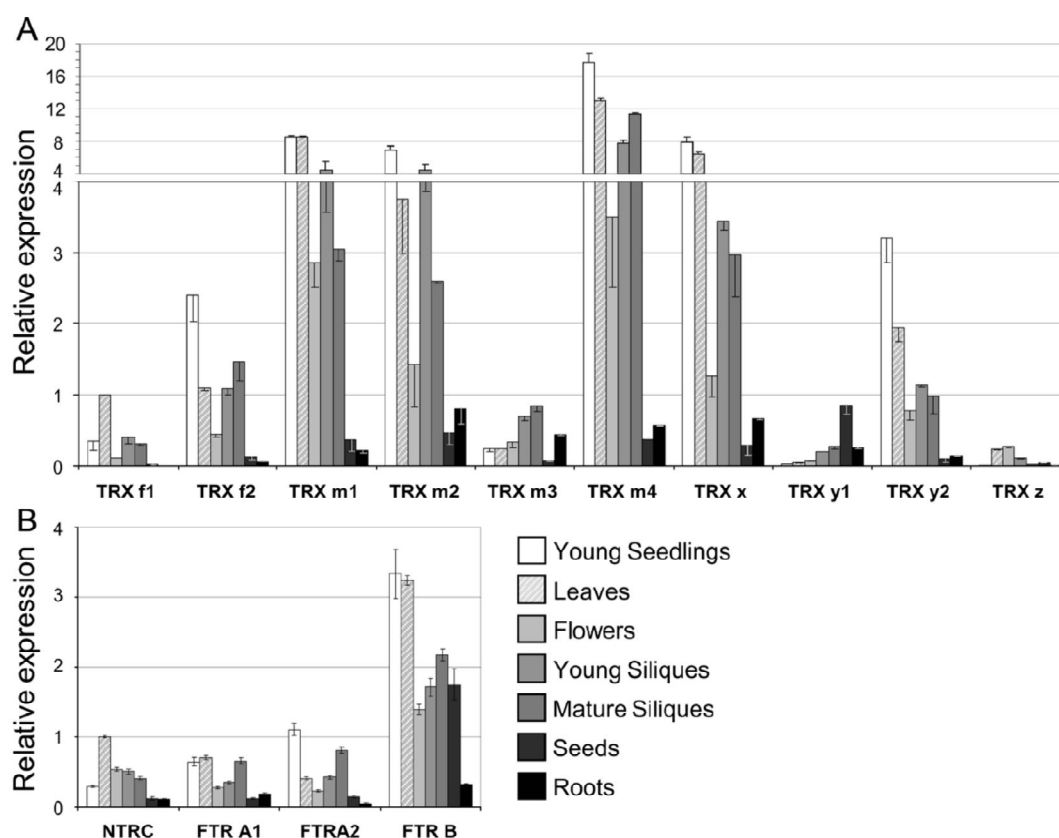


Fig. 1. Expression of plastidial TRX and TRX reductases in *Arabidopsis*. Quantitative real-time PCR analyses were performed on total RNA isolated from young seedlings, leaves, flowers, young and mature siliques, seeds, and roots. Transcript levels are the result of three independent experiments and were normalized by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using *PP2A* as standard (Czechowski *et al.*, 2005). (A) Expression patterns of plastidial TRX genes; *trxf1* transcripts level in leaves used as calibrator. (B) Expression patterns of *ntrc* and *ftr* subunits genes; *ntrc* transcripts level in leaves used as calibrator.

has been engineered (C207A/C365A/C377A mutant, Ruelland *et al.*, 1997). This mutant has a basal activity and is more easily activated, due to a less negative redox potential. It is activated by plastidial TRX isoforms that do not activate the wild-type enzyme, such as TRXx and y (Collin *et al.*, 2003, 2004). Unlike TRXm1 used as a positive control, TRXz proved inefficient (even at 100 μ M) towards mutant NADP-MDH in the presence of a high (100mM) DTT concentration necessary to reach a complete reduction of this TRX. Thus, TRXz is unable to activate NADP-MDH (Table 1).

This study also tested the capacity of TRXz to mediate proton donation to 2-Cys PRX by following the reduction of H_2O_2 by PRX in the presence of DTT. 2-Cys PRX is known to be reduced efficiently by TRXx, to a lesser extent by TRXy, and not by TRXm3 (Collin *et al.*, 2003, 2004). Fig. 2 shows that indeed TRXx is the best reductant for 2-Cys PRX, Trxm3 being quite inefficient. TRXz was as efficient as TRXy1, which demonstrated that the preparation was redox active. Thus, unlike poplar TRXz (Chibani *et al.*, 2011), *Arabidopsis* TRXz can donate electrons to homologous 2-Cys PRX.

Table 1. Activation test of mutant NADP-MDH by TRXz.

Test condition	Initial rates of reduction [μ moles oxidized NADPH mg^{-1} NADP-MDH s^{-1}]
DTT alone	$0.71 \pm 0.06s$
TRXm1	1.36 ± 0.09
TRXz	0.73 ± 0.07
100 μ M TRXz	0.79 ± 0.10

Mutant NADP-MDH (0.9 μ g) was incubated with 100mM DTT and various concentrations of TRXz. Activation by TRXm1 was used as positive control. Activity was measured spectrophotometrically at 340nm through the oxaloacetate-dependent disappearance of NADPH. Activation treatments were made at room temperature for 20 min in presence of DTT (100mM) alone or with TRX (5 μ M unless otherwise mentioned).

FTR reduces efficiently TRXx and y but cannot reduce TRXz

FTR is the known reductant of plastidial TRXf and m but its capacity to reduce the more recently identified *Arabidopsis*

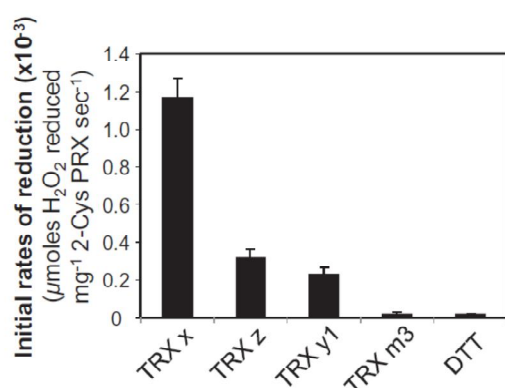


Fig. 2. Efficiency of TRXz in the reduction of 2-Cys PRX compared to other plastidial TRX. The enzyme 2-Cys PRXA (20 μM) was incubated in the presence of 400 μM DTT, 600 μM H₂O₂, and 10 μM TRX. As a control, 2-Cys PRX was incubated without TRX (DTT). Data are the mean of three independent experiments. Error bars correspond to standard deviation.

TRX isoforms x, y, and z was never studied. This study tested the capacity of FTR to reduce plastidial *Arabidopsis* TRX in a reconstituted system comprising illuminated pea thylakoids, *Arabidopsis* ferredoxin 2 (Fd) and spinach FTR (Droux *et al.*, 1987). In this system, TRXx, y1, and y2 were able to activate mutant NADP-MDH with efficiencies comparable to TRXf1 (Fig. 3). In the dark, or when a component of the activation mixture was omitted, no NADP-MDH activation was observed (Fig. 3 and data not shown). These data provide evidence that TRXx and y can be efficiently reduced by FTR. Since TRXz is not able to activate mutant NADP-MDH, its reduction was followed by redox Western blotting. Indeed, we observed that

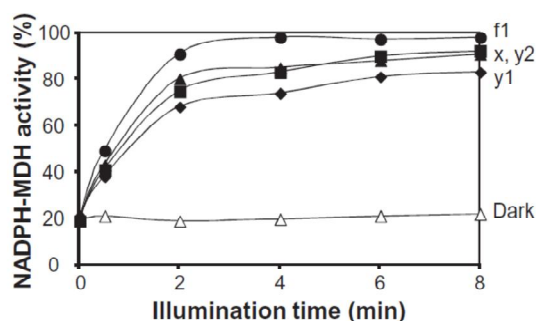


Fig. 3. Activation of NADP-MDH by plastidial TRXf, x, and y in the light, in a Fd/TRX reconstituted system. Mutant NADP-MDH was illuminated at 120 μE m⁻² s⁻¹ in the presence of freshly prepared thylakoids (equivalent to 20 μg chlorophyll), 5 μM ferredoxin, 2 μM FTR, and 25 μM TRXf1 (f1, black circles), TRXy1 (y1, black diamonds), TRXy2 (y2, black triangles), or TRXx (x, black squares). TRXy2 was also tested in the dark (open triangles). Experiments were reproduced three times; a representative set of data is shown.

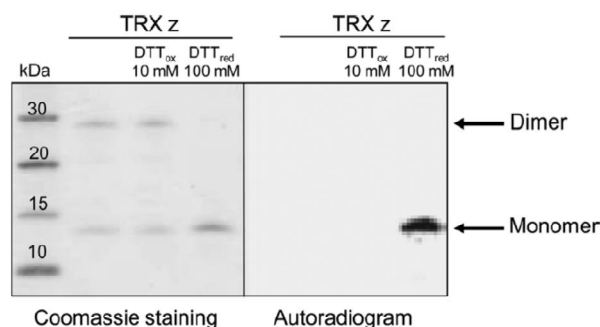


Fig. 4. Redox and oligomerization state of TRXz. TRXz was alkylated with [¹⁴C] iodoacetamide after an oxidizing (DTTox 10 mM) or a reducing treatment (DTTred 100 mM). The samples were separated by non-reducing SDS-PAGE. Proteins and radiolabelling were visualized by Coomassie blue staining and exposure of the dried gel to a low-energy imaging screen, respectively.

TRXz formed dimers when oxidized and was monomerized upon reduction by DTT. It was checked that monomerization was correlated with the appearance of free thiols on the protein using radiolabelling with the thiol-alkylating agent [¹⁴C] iodoacetamide. A strong and specific labelling was observed for the monomer in its reduced form, most probably corresponding to the reduction of the active-site disulphide (Fig. 4). As there was no labelling of the dimer, it should correspond to oxidized protein. This hypothesis is strengthened by the absence of labelling of the oxidized monomer, corresponding to the initial redox state of the TRXz purified preparation and after a treatment with DTTox (Fig. 4). This observation allowed the monomerization/dimerization behaviour of the protein to be used as a test of reduction/oxidation. TRXz reduction by FTR was tested in the reconstituted light system described above (Fig. 5). Upon illumination, no monomerization of TRXz was observed. In the same experiment, the light-driven reduction of TRXf1 (evidenced by NADP-MDH activation) proved efficient (data not shown). Inability of FTR to reduce TRXz was confirmed using an *in vitro* reconstituted 'dark' system consisting of NADPH, FNR, Fd, and FTR (Supplementary Fig. S5B, lane 9). These results provide evidence that FTR can be the physiological reductase of plastidial TRXx and y, with comparable efficiencies to TRXf. Noteworthy is the fact that TRXz is the first plastidial TRX not reduced by its classic reductase.

NTRC is not an efficient alternative reducing system for plastidial TRX

Most plastidial TRX genes are expressed in green tissues but, as mentioned above, some isoforms, such as TRXy1, are predominantly present in non-photosynthetic tissues where the mRNA corresponding to NTRC could be detected. Moreover, as FTR cannot reduce TRXz, NTRC could possibly be its physiological substitute. The *Arabidopsis* recombinant NTRC was produced and purified. Its functionality was confirmed by its capacity to mediate an efficient degradation of H₂O₂ by 2-Cys

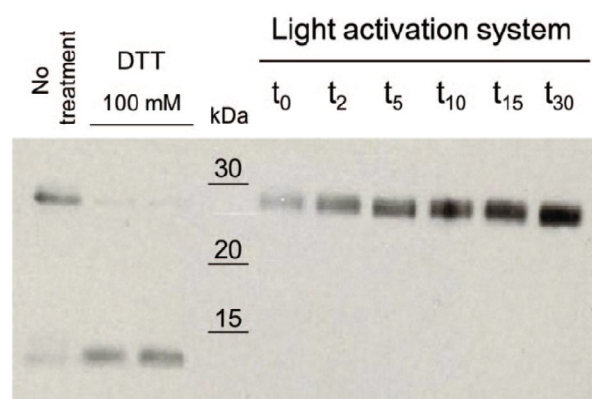


Fig. 5. Reduction test of TRXz by FTR in a reconstituted light-driven Fd/TRX system. Experimental conditions were as described in legend of Fig. 3. As controls, oxidized TRXz (10 μ M) was incubated without (lane 1) or with (lanes 2 and 3) 100 mM DTT. For the reduction test of TRXz by FTR, TRXz (25 μ M) was incubated in the presence of thylakoids, 5 μ M Fd, and 10 μ M FTR in the light. Aliquots were withdrawn periodically, the proteins were alkylated, subjected to non-reducing SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membrane, and probed with anti-Strep-tag antibody. Experiment was reproduced four times; a representative experiment is shown.

PRXA (Supplementary Fig. S3). The reduction of the five types of plastidial TRX by NTRC was then assayed using DTNB as a final electron acceptor, as this is a useful tool for measuring TRX oxidoreductase capacity. At 20 nM, NTRC alone, probably due to its own TRX domain, displays a TRX reductase activity with a k_{cat} value (s^{-1}) of 4.47 ± 0.59 . This activity increases 2–3-fold in presence of plastidial TRX (Supplementary Fig. S4A). However, this reduction rate corresponds to the basal rate observed with the cytosolic NTRA for TRXf1 that is 5-fold lower than the reduction rate of the cytosolic TRXh3 (Supplementary Fig. S4B). Moreover, when the ability of NTRC to reduce TRXz was tested by following its monomerization by redox Western blotting, no increase of the monomeric form at the expense of the dimers was observed (Supplementary Fig. S5A). The faint intermediate molecular weight bands, more abundant in aged preparations (data not shown), most probably correspond to the dimer's conformational variants as they are recognized by the anti-TRXz antibody and disappear upon reduction. It is concluded that TRXz cannot be efficiently reduced by NTR.

TRXz is not reduced by the GSH/GRX system

Previous data have demonstrated that a subgroup of cytosolic TRX, which are not reduced by NTR, can be reduced by GRX, which is itself reduced by GSH (Gelhay *et al.*, 2003). In this system, known as the GSH/GRX system, the transmission of the redox signal is mediated from NADPH to GSH via GR. None of TRXf, m, x, and y are reduced by GSH (data not shown). However, Chibani *et al.* (2011) have recently found close values for the redox midpoint potentials (E_m) of TRXz and GSH

(Noctor, 2006). The ability of TRXz to be reduced by GR, GSH, and/or a plastidial GRX (GRXS16; Bandyopadhyay *et al.*, 2008) was tested by following its reduction through its monomerization. No monomerization of TRXz occurred with any of these components (Supplementary Fig. S5B). Thus it is concluded that none of the components of the GSH/GRX system can reduce TRXz *in vitro*.

Plastidial TRX can reduce TRXz

The E_m value for the catalytic disulphide of TRXz was found to be -311 mV at pH 7.9 (Chibani *et al.*, 2011), which is less negative than the E_m values of the other plastidial TRX (from -365 to -335 mV; Collin *et al.*, 2003, 2004). Therefore, the ability of other plastidial TRX to reduce TRXz was investigated (Fig. 6). While 1 mM DTT could not directly reduce TRXz, in presence of TRXf or in the amount of monomeric TRXz was largely increased at the expense of the dimeric form (Fig. 6A). In comparison, TRXx and y exhibited a significant, although lower, efficiency (Fig. 6B). These data demonstrate that TRXz can be reduced by other plastidial TRX *in vitro*.

Discussion

The main goal of the present work was to test *in vitro* the ability and specificity of plastidial reductases to reduce the various

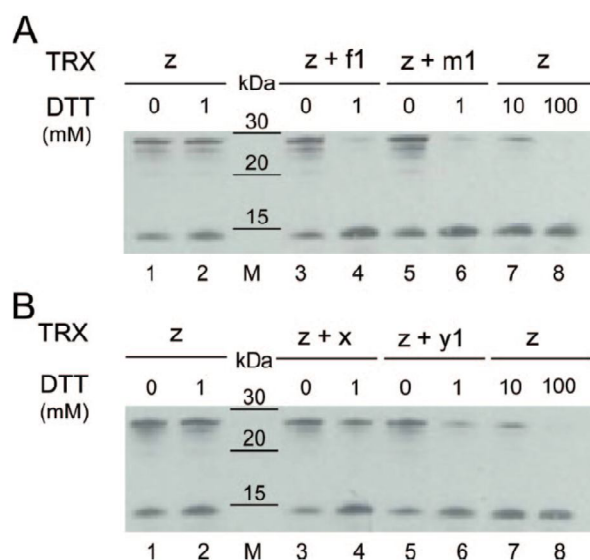


Fig. 6. Reduction of TRXz by other plastidial TRX. TRXz (10 μ M) was incubated without (lane 1) or with DTT (1, 10 or 100 mM, lanes 2, 7, 8 respectively) or with 10 μ M of another plastidial TRX (f1, m1: panel A; x, y1: panel B) without (lane 3, 5) or with DTT (1 mM, lane 4, 6), for 15 min at room temperature. Proteins were then alkylated, subjected to non-reducing SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membrane, and probed with an anti-TRXz antibody. Experiments were reproduced four times; a representative experiment is shown.

plastidial TRX. As a preliminary test, the results show, using qRT-PCR, that the 10 genes encoding plastidial TRX together with the three genes encoding FTR subunits and the gene encoding NTRC were expressed in the same organs at the same time (Fig. 1) and thus could be partners. These data will need to be further completed with a study at the protein level and gene expression analyses in different cell types. The detection of a messenger RNA suggesting the presence of the translated corresponding protein, these findings prompted the testing of both FTR and NTRC in their capacities to reduce plastidial TRX and particularly the more recently identified TRXx, y, and z isoforms from *Arabidopsis*.

FTR is the well-known reductase for TRXf and m isoforms, TRXx, y, and z were found as efficient proton donors to peroxidoreductases (Collin *et al.*, 2003, 2004; present work: Fig. 2) but the upstream reduction of TRX by following PRX activity in a reconstituted Fd/FTR/TRX light activation system cannot be easily tested. Indeed, reactive oxygen species production by illuminated thylakoids interferes with the activity test. However, the ability of FTR in reducing TRXx and y could be tested by following the activation of an engineered mutant NADP-MDH enzyme which can be reduced by these TRX isoforms (Fig. 3). The results demonstrate that TRXx and y are reduced by FTR with efficiencies comparable to those of the m- and f-type isoforms (Droux *et al.*, 1987). Thus, in the light, FTR is clearly the reducing system for plastidial TRXf, m, x, and y in *Arabidopsis*. However, the recent finding of f- and m-type TRX in non-photosynthetic organs raised the question of their reducing system in heterotrophic plastids (Traverso *et al.*, 2008). Moreover, the presence of a complete FTR system in amyloplasts was demonstrated (Balmer *et al.*, 2006). In roots, FNR reduces type III Fd which is more easily reduced than leaf isoforms, as it displays a less negative E_m (Hanke *et al.*, 2004). This property favours the electron transfer from NADPH to FTR via FNR and Fd. The functionality of this system was already tested by König *et al.* (2002) for TRXf and m but still needs to be tested for other plastidial TRX isoforms, especially the ones expressed in non-photosynthetic tissue such as TRXm3 and y1.

The ability of FTR in reducing TRXz could be assessed in the reconstituted light system by following the reduction state of TRXz through its monomerization. Indeed, TRXz could not activate NADP-MDH, either wild-type or mutant, but the labeling experiment (Fig. 4) showing that only the reduced monomer can be derivatized offered a simple way to observe the reduction of this TRX. The data show that FTR cannot reduce TRXz in the light (Fig. 5) in contrast with all the other plastidial TRX. This finding is not consistent with the work of Chibani *et al.* (2011) where a heterologous NADPH-driven FTR reduction system was used. These authors assessed the reduction of poplar TRXz by a shift of migration during non-reducing SDS-PAGE following the alkylation with methoxyl-PEG maleimide. A shift of 15 kDa, instead of 4 kDa as expected for the alkylation of two thiol groups, was obtained. This form could correspond to the dimer observed in the current experiments. A dimerization/monomerization upon oxidation/reduction was previously observed for TRXf which contains a third Cys residue responsible for this behaviour (Michelet *et al.*, 2005). In the mature *Arabidopsis* TRXz, no additional Cys residue is found, indicating that dimerization is linked to the specific properties of this isoform.

Noteworthy is the fact that, in the light activation experiment when TRXz was mixed with thylakoid membranes, no monomeric form was observed at all (Fig. 5), even in the dark, while the TRXz preparations always appeared as a mixture of monomers and dimers, even in the NADPH/FNR/FTR/Fd reconstituted system (Supplementary Fig. S4). Moreover, the amount of TRXz seemed to be lower in the dark (time 0) and to increase upon illumination (Fig. 5). Therefore, TRXz might interact (directly or indirectly) with thylakoid membranes in the dark and could be released in the light. Such a phenomenon was recently reported for FNR (Benz *et al.*, 2010) and would deserve a more detailed study.

The NTR domain of NTRC being active in the reduction of the TRX domain, it has been proposed as a possible alternative plastidial TRX-reducing system (Serrato *et al.*, 2004). The present work tested *Arabidopsis* NTRC with homologous TRX isoforms belonging to the five plastidial types and NTRC could not reduce efficiently any plastidial TRX *in vitro*. This confirms the results obtained by others (Serrato *et al.*, 2004; Pérez-Ruiz *et al.*, 2006; Chibani *et al.*, 2011) testing heterologous proteins.

The data show that FTR is the only reductase capable to reduce TRXf, m, x, and y in plastids and reveal that even though TRXz is expressed mainly in green tissues, it is not reduced by any known plastidial TRX-reducing system. Interestingly, this study found that other plastidial TRX can reduce TRXz. This is thermodynamically feasible as these TRX have a E_m less negative than the E_m of TRXz (Collin *et al.*, 2003, 2004; Chibani *et al.*, 2011). This is the first example, as far as is known, of a TRX reducing another TRX. Overall, these biochemical data underscoring that TRXz stands out from the other plastidial isoforms are consistent with the severe albino phenotype of the *Arabidopsis trxz* knockout mutant (Arsova *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2010) contrasting with the mutants of the other plastidial TRX that do not exhibit a visible phenotype under standard growth conditions (Laugier *et al.*, 2012).

TRXz was previously identified in a proteomic study as a component of transcriptionally active chromosome in plastids (pTAC; Pfalz *et al.*, 2006) and more recently as a subunit of a complex formed with the plastid-encoded RNA polymerase (PEP; Schröter *et al.*, 2010). *trxz* mutant or silenced plants are affected in the expression of the chloroplast genome, particularly the genes transcribed by the PEP (Arsova *et al.*, 2010; Schröter *et al.*, 2010). This strongly suggests the implication of TRXz in the transcription of the plastome. TRXz interacts with several targets, including 2 Cys-PRX, FNR, and two proteins with similarities to plastid fructokinase-like proteins (Schröter *et al.*, 2010) previously identified as a component of pTAC (Pfalz *et al.*, 2006) but with no fructokinase activity (Arsova *et al.*, 2010). It has been shown that TRXz acts as an adaptor protein between the receptor-like protein Cf-9 and the Ser/Thr kinase AC1K1 in the cytosol of tomato (Nekrasov *et al.*, 2006). Recently, Schröter *et al.* (2010) proposed that TRXz could play a similar adaptor role as a subunit of the PEP complex for regulation of plastid gene expression. TRXz would be an additional key player of photosynthetic gene expression (Dietz and Pfannschmidt, 2011).

Overall, this points to a unique role of TRXz, which indeed possesses TRX activity. TRXz appears as an important sensor of the redox status of the chloroplast being potentially oxidized

by 2-Cys PRX (sensing reactive oxygen species) and reduced by other TRX (sensing light indirectly) revealing its potential important role in the redox homeostasis of the chloroplast.

Supplementary material

Supplementary data are available at *JXB* online.

Supplementary Table S1. Sequences of the primers used for quantitative real-time PCR analysis.

Supplementary Table S2. Summary of the different proteins used in this study.

Supplementary Fig. S1. Anti-TRXz antibody specificity.

Supplementary Fig. S2. Expression patterns of *trx1*, *f2*, *m1*, *m2*, *m3*, *m4*, *x*, *y1*, *y2*, and *z* and the *ntre*, *ftr1*, and *ftrb* genes in *Arabidopsis* tissues and organs found in microarray databases.

Supplementary Fig. S3. Reduction of hydrogen peroxide by 2-Cys PRX using NTRC as an electron donor.

Supplementary Fig. S4. Reduction test of plastidial TRX by NADPH-dependent TRX reductases.

Supplementary Fig. S5. Reduction of TRXz by NTRC, GSH, GRX, GR, or FTR studied by redox Western blotting.

Acknowledgements

This work was supported by MENRT grants to A.-S.B. and V.M. and the Saclay Plant Sciences programme (SPS, ANR-10-LABX-40). The authors are grateful to Dr N. Rouhier for providing GRXS16 protein, to Dr M. Zaffagnini for technical advices and scientific discussions and to Dr M. Miginiac-Maslow for support, helpful suggestions and critical reading of the manuscript.

References

- Alkhalfioui F, Renard M, Montrichard F. 2007. Unique properties of NADP-thioredoxin reductase C in legumes. *Journal of Experimental Botany* **58**, 969–978.
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F. 2010. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **22**, 1498–1515.
- Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schürmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2006. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 2988–2993.
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot J-P, Johnson M K, Rouhier N. 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *The EMBO Journal* **27**, 1122–1133.
- Benz JP, Lintala M, Soll J, Mulo P, Bolter B. 2010. A new concept for ferredoxin NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in Plant Science* **15**, 608–613.
- Broin M, Cuine S, Eymery F, Rey P. 2002. The plastidic 2-cysteine peroxidoredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *The Plant Cell* **14**, 1417–1432.
- Buchanan BB. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31**, 341–374.
- Chibani K, Tarrago L, Schürmann P, Jacquot J-P, Rouhier N. 2011. Biochemical properties of poplar thioredoxin z. *FEBS Letters* **585**, 1077–1081.
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M. 2003. The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins – new functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23747–23752.
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz K-J, Issakidis-Bourguet E. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type. *Plant Physiology* **136**, 4088–4095.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. 2005. Genome-wide identification of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- Dietz K-J, Pfannschmidt T. 2011. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiology* **155**, 1477–1485.
- Droux M, Miginiac-Maslow M, Jacquot JP, Gadal P, Crawford NA, Kosower NS, Buchanan BB. 1987. Ferredoxin-thioredoxin reductase – a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**, 372–380.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP. 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters* **555**, 443–448.
- Hanke GT, Kimata-Arigo Y, Taniguchi I, Hase T. 2004. A post genomic characterization of *Arabidopsis* ferredoxins. *Plant Physiology* **134**, 255–264.
- Issakidis E, Saarinen M, Decottignies P, Jacquot JP, Crétin C, Gadal P, Miginiac-Maslow M. 1994. Identification and characterization of the 2nd regulatory disulfide bridge of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 3511–3517.
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M. 2001. Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *The Plant Journal* **25**, 127–135.
- Jacquot J-P, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Maréchal P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y. 1994. *Arabidopsis thaliana* NADPH thioredoxin reductase cDNA characterization and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **235**, 1357–1363.
- Johansson K, Ramaswamy S, Saarinen M, Lemaire-Chamley M, Issakidis-Bourguet E, Miginiac-Maslow M, Eklund H. 1999. Structural basis for light activation of a chloroplast enzyme: the structure of sorghum NADP-malate dehydrogenase in its oxidized form. *Biochemistry* **38**, 4319–4326.

- Keryer E, Collin V, Lavergne D, Lemaire SD, Issakidis-Bourguet E.** 2004. Characterization of *Arabidopsis* T-DNA mutants for the variable subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Photosynthesis Research* **79**, 265–274.
- König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz K-J.** 2002. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 5738–5743.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienemberger JM, Bonnard G, Meyer Y.** 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 14144–14149.
- Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schottler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A, Weis E, Miginiac-Maslow M, Dietz K-J.** 2006. Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *The Plant Journal* **45**, 968–981.
- Laugier E, Tarrago L, Courteille A, Innocenti G, Eymery F, Rumeau D, Issakidis-Bourguet E, Rey P.** 2012. Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/PCE.12005.
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E.** 2007. Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics* **51**, 343–365.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Marchand C, Vanacker H, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Le Maréchal P, Decottignies P.** 2010. Thioredoxins targets in *Arabidopsis* roots. *Proteomics* **10**, 2418–2428.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB.** 2010. A membrane associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 3900–3905.
- Mestres-Ortega D, Meyer Y.** 1999. The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**, 307–316.
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F.** 2005. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Research* **86**, 419–433.
- Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin JM, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Lemaire SD.** 2005. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 16478–16483.
- Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Keryer E, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD.** 2006. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynthesis Research* **89**, 225–245.
- Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E.** 2009. Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Letters* **583**, 2827–2832.
- Nekrasov V, Ludwig AA, Jones JDG.** 2006. CITRX thioredoxin is a putative adaptor protein connecting Cf-9 and the ACIK1 protein kinase during the Cf-9/Avr9-induced defence response. *FEBS Letters* **580**, 4236–4241.
- Noctor G.** 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* **29**, 409–425.
- Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang C, Wang L, Xie W, Xiong L, Zhang Q, Lian X.** 2008. Sequence and analysis of the thioredoxin gene family in rice. *Molecular Genetics and Genomics* **280**, 139–151.
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz K-J, Oelmüller R.** 2006. pTAC2, -6 and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *The Plant Cell* **18**, 176–197.
- Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ.** 2006. Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant Cell* **18**, 2356–2368.
- Reichheld J-P, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y.** 2005. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **579**, 337–342.
- Ruelland E, Lemaire Chamley M, Le Marechal P, Issakidis-Bourguet E, Djukic N, Miginiac-Maslow M.** 1997. An internal cysteine is involved in the thioredoxin-dependent activation of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19851–19857.
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M.** 1999. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends in Plant Science* **4**, 136–141.
- Schröter Y, Steiner S, Matthai K, Pfannschmidt T.** 2010. Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics* **10**, 2191–2204.
- Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ.** 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 43821–43827.
- Traverso JA, Vignols F, Cazalis R, Serrato AJ, Pulido P, Sahrawy M, Meyer Y, Cejudo FJ, Chueca A.** 2008. Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1267–1277.
- Valerio C, Costa A, Marri L, Issakidis-Bourguet E, Pupillo P, Trost P, Sparla F.** 2010. Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 545–555.
- Vieira Dos Santos C, Laugier E, Tarrago L, Massot V, Issakidis-Bourguet E, Rouhier N, Rey P.** 2007. Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Letters* **581**, 4371–4376.

Table S1

Table S1. Sequences of the primers (forward and reverse) used for quantitative RT-PCR analysis (see procedure below).

	Forward	Reverse
FTR A1	TGAAGGTCGTGGTCTTGTTAAA	CCAGGTTCCAGTAAACACAACA
FTR A2	CAGCTAATCTGCCGTTTAAGGTA	CACGGATCAATTAACCTCGAACTC
FTR B	GCTAACATGTGAGAGAGCTGGTT	GGGGTATCAATGTACAAGACTGC
NTRC	CAAGGTGGTCGATGAGTATAACC	TAGTCCTGAGCATTTCCTTGTTT
TRX f1	ACGACGACGTTGTGTTTCTAAAG	CTTCCTTGACAACCTTGTTATCC
TRX f2	AGCTATCGGAGAAGTACCAGGAC	CTTCAATGGCTGCAAGTAAGTCT
TRX m1	TAACACTGATGAGTCTCCTGCAA	GATGCTGGTTGCTAAAGTGTCTT
TRX m2	TGAAGCTCAGGAACTACTACCG	CAGTGTAATGCTGTGCTAGATCG
TRX m3	AGTTACACAACGATCATGGGAAG	CGTCTATTATCCTGTGGACCATC
TRX m4	TATGATTACCCCATAGTTGACC	CTATCTTTCTTCTCACCGCCTTT
TRX x	CAGCTATGGAAGCCTTATCTCAG	GTAATAGCACCTTCCCTTCTGCT
TRX y1	GAGGCACTTCCTACTTTTCATCCT	GTTTCATGATCCAACCTATGGCTTC
TRX y2	CTGAGAAGTACCCAAGTCTTGCT	GAATTCTCAATACGCTCAACGAG
TRX z	CCGTGTTGTTTGCATTTGAG	GGATCCGACCAGATCAACAG
PP2A	GATGCAATCTCTCATTCCGATAG	AGAGCTTGATTTGCGAAATACC

Gene expression profiling was conducted by real-time quantitative RT-PCR using triplicate reactions for each sample and a gene-specific primer pair designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). Reactions were assembled with 5 ng/5 μ L cDNA template, 2.5 μ L primer mix containing 250 nM each of gene-specific forward and reverse primers (reported to a standard curve of control DNA at concentrations from 4 pg to 70 ng), and 7.5 μ L SYBR Green reagent (Roche Diagnostics) in 96-well plates sealed with optical film. Reactions were conducted using a LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). The amplification protocol was: activation at 95°C for 10 min, 45 cycles of amplification at 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, 72°C for 15 s, and then 95°C for 30 s. Melting curves were obtained after each run starting from 65°C to 95°C to confirm that single, specific products were produced. The results were standardized by comparing the data to reference gene PP2A (At1g13320, a constitutively expressed protein phosphatase 2A, Czechowski et al., 2005). The quantification of gene expression was performed using the comparative C_T method (Livak and Schmittgen, 2001).

Table S2

Table S2. Summary of the different proteins used in this study.

Name	Origin	Tag	Tag type	Référence
TRX f1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Collin et al., 2003
TRX m1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Collin et al., 2003
TRX x	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Collin et al., 2003
TRX y1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Collin et al., 2004
TRX z	<i>Arabidopsis thaliana</i>	yes	<i>Strep</i>	This work
TRX h3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Jacquot et al., 1994
Fd 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	yes	His	This work
FTR	spinach	no	-	Droux et al., 1987
FNR	spinach	no	-	Droux et al., 1987
NTR A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	yes	His	Jacquot et al., 1994
NTR C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	yes	His	This work
NADP-MDH	<i>Sorghum vulgare</i>	no	-	Issakidis et al., 1992
$\Delta 15$ NADP-MDH	<i>Sorghum vulgare</i>	no	-	Johansson et al., 1999
C207A/C365A/C377A NADP-MDH	<i>Sorghum vulgare</i>	no	-	Ruelland et al., 1997
2 Cys-PRX A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	yes	His	Broin et al., 2002
GRX S16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	no	-	Bandyopadhyay et al., 2008

All proteins were recombinantly obtained from *E. coli* except FTR and FNR extracted from plant leaves. Procedures for recombinant proteins first obtained in the context of this study were as follows. cDNA sequences corresponding to mature AtNTRC (Ser67) and AtFd2 (Ala53) were cloned in frame with a His-tag, in pET-16b and pET-3d vector (Novagen), respectively. The cDNA sequence corresponding to mature AtTRXz (Lys79) was cloned in frame with a *Strep*-tag in pGENI vector, a derivative vector of pET-16b. They were expressed in the companion *E. coli* BL21 (DE3) strain. Bacteria were cultured in LB medium supplemented with 100 mg/L ampicillin at 37°C. AtNTRC, AtTRXz and AtFd2 proteins productions were induced with 500 μ M isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, with the addition of 0.1 g/L ammoniacal ferrous citrate (Boyer et al., 2006) for AtFd2, for 18 h at 30°C. Cells

were harvested by centrifugation at $8,000 \times g$ for 15 min, resuspended in 30 mM Tris-HCl, pH 7.9 with a cocktail of protease inhibitors (complete, mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics), disrupted by three passages through a French press (10,000 p.s.i.) and soluble protein fraction of the extract was cleared by centrifugation at $19,000 \times g$, 4°C for 30 min. For AtNTRC and AtFd2, the supernatant was applied onto a Ni^{2+} HiTrap chelating resin (HiS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich) pre-equilibrated with 30 mM Tris-HCl, pH 7.9. After washing with 5-10 mM imidazole, the recombinant protein was eluted with 50 mM imidazole and dialysed against 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA. For AtTRXz, the supernatant was loaded onto a *Strep*-Tactin affinity column (*Strep*-Tactin® Sepharose®, IBA) pre-equilibrated with buffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). After washing with buffer W, the recombinant protein was eluted with 2.5 mM desthiobiotin and dialysed against 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA. Purity and molecular mass of the proteins were checked by SDS-PAGE revealed by Coomassie blue staining. Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm for NTRC and TRXz and 422 nm for Fd, using molar extinction coefficients of $40,550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for NTRC, $10,160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for TRXz and $9.68 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for Fd. The FAD specific A_{454}/A_{378} ratio for NTRC was close to 1.1. The other proteins used in this study were obtained and purified as previously described: recombinant Arabidopsis plastidial TRX (Collin et al., 2003; 2004), recombinant cytosolic Arabidopsis TRXh3 (Jacquot et al., 1994), spinach FTR and FNR (Droux et al., 1987), recombinant Arabidopsis NTRA (Jacquot et al., 1994), recombinant *Sorghum vulgare* NADP-MDHs ($\Delta 15$ -NADP-MDH: wild-type NADP-MDH, and C207A/C365A/C377A NADP-MDH: mutant NADP-MDH) (Issakidis et al., 1994; Ruelland et al., 1997; Johansson et al., 1999), recombinant Arabidopsis 2-Cys PRXA (2-Cys PRX) (Broin et al., 2002) and recombinant Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin GRXS16 (CGFS type, Bandyopadhyay et al., 2008).

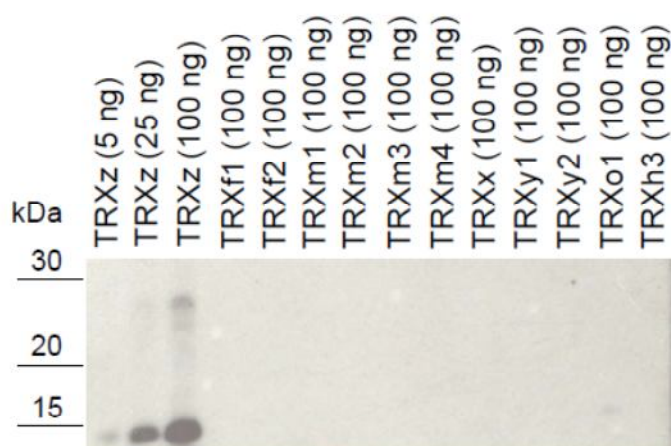
Figure S1

Figure S1. Anti-TRX z antibody specificity. Anti TRX z antibody was tested against all the plastidial (f1, 2; m1, 2, 3, 4; x; y1, 2; z), a mitochondrial (o3) and a cytosolic (h3) TRX. After separation by SDS-PAGE, proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membrane and probed with the anti-TRXz antibody.

Figure S2

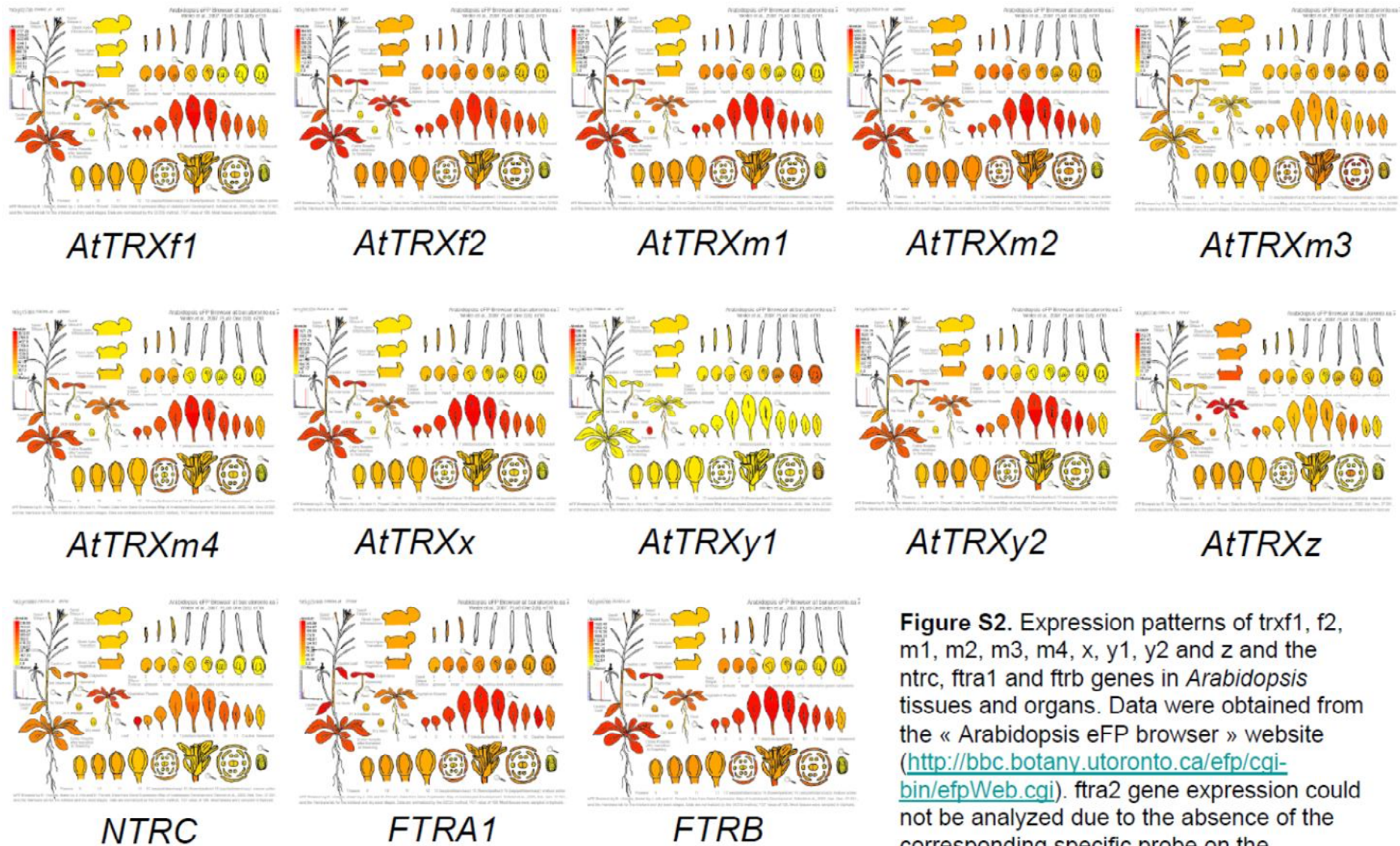


Figure S2. Expression patterns of *trxf1*, *f2*, *m1*, *m2*, *m3*, *m4*, *x*, *y1*, *y2* and *z* and the *ntrc*, *ftra1* and *ftrb* genes in *Arabidopsis* tissues and organs. Data were obtained from the « *Arabidopsis* eFP browser » website (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). *ftra2* gene expression could not be analyzed due to the absence of the corresponding specific probe on the Affymetrix *Arabidopsis* microarray.

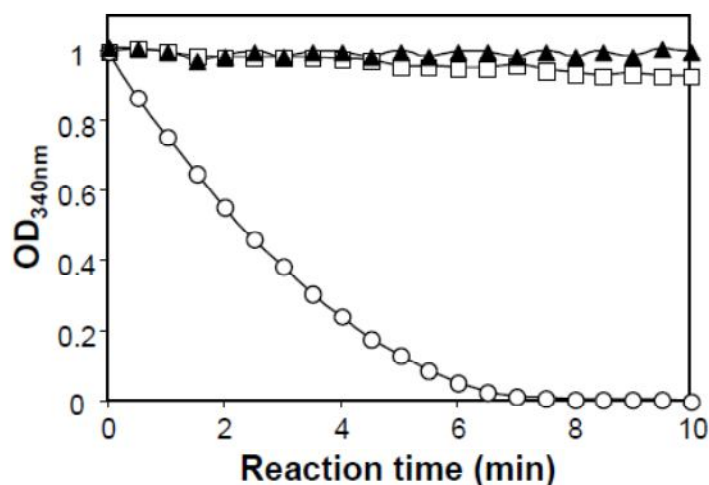
Figure S3

Figure S3. Reduction of hydrogen peroxide by 2-Cys PRX using NTRC as an electron donor.

Arabidopsis NTRC (200 nM) was incubated in presence of 150 μM NADPH and its capacity as an electron donor to 2-Cys PRX A (20 μM) was tested through its capacity to reduce H₂O₂ (1 mM). Reaction was spectrophotometrically monitored by the disappearance of the reduced cofactor at 340 nm. Data were normalized to the initial OD. Open squares: NTRC alone, open circles: NTRC plus 10 μM 2-Cys PRX, black triangles: 2-Cys PRX without NTRC. Experiments were reproduced 3 times, a representative set of data is shown.

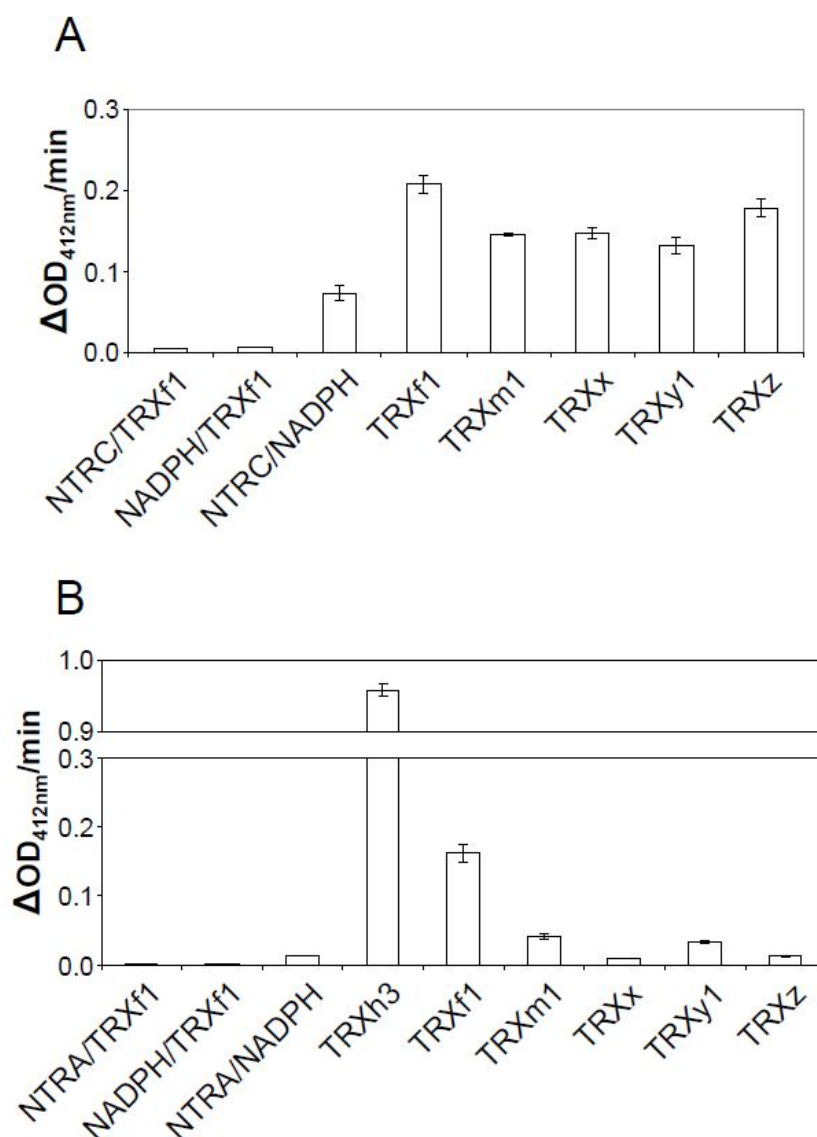
Figure S4

Figure S4. Reduction test of plastidial TRX by NADPH-dependent TRX reductases. NTRC (20 nM) or NTRA (20 nM) was incubated in the presence of 150 μ M NADPH and 1 mM DTNB with 10 μ M TRX. The reaction of DTNB with free thiols was followed spectrophotometrically at 412 nm through the appearance of TNB⁻ upon time. As controls, we tested TRXf1 in the absence of NADPH and NTRC or NTRA; the basal activity of NTRC or NTRA was measured in presence of NADPH without TRX. Data are the mean of 3 independent experiments. Error bars correspond to standard deviation.

Figure S5

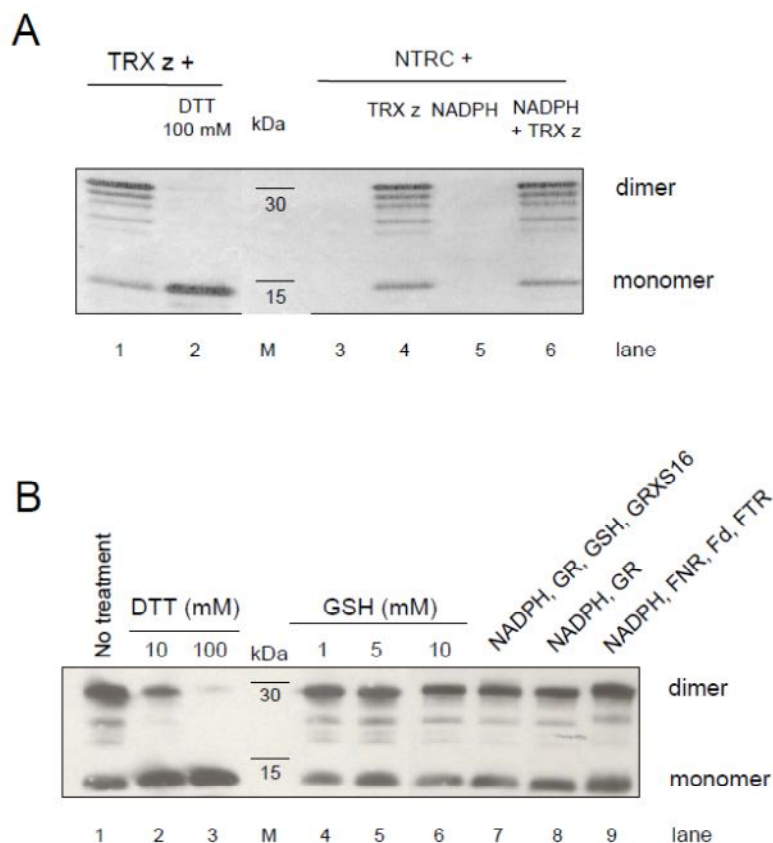


Figure S5. Reduction of TRXz by NTRC, GSH, GRX, GR or FTR studied by redox western.

A- Reduction by NTRC: As a control for reduction, oxidized TRXz (10 μ M; lane 1) was fully reduced with 100 mM DTT (lane 2). Reduction of TRXz by NTRC was tested in the absence (lane 4) or the presence (lane 6) of NADPH.

B- Reduction by GSH, GRX, GR or FTR: As a control for reduction, oxidized TRXz (10 μ M; lane 1) was incubated with 10 or 100 mM DTT (lanes 2 and 3). Reduction of TRXz was tested either with reduced glutathione (GSH) (1, 5 or 10 mM; lanes 4 to 6) or 300 μ M NADPH, 6 μ g/mL bakers yeast glutathione reductase (GR), 5 mM GSH and 10 μ M of chloroplastic glutaredoxin GRXS16 (lane 7) or 300 μ M NADPH and 6 μ g/mL GR (lane 8) or 20 μ M NADPH, 40 nM FNR, 1 μ M Fd and 1 μ M FTR (lane 9).

After a 15 min treatment at room temperature, proteins were alkylated and subjected to non reducing SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membrane and probed either with the anti-TRXz specific antibody (panel A) or with the anti Strep-tag antibody (panel B). The reduction of TRXz was followed through its monomerization. Experiments were reproduced 3 times, a representative experiment is shown.

B. Données complémentaires non publiées

1) Test de réduction de la TRX z par la NTRC

Dans l'étude réalisée sur la TRX z de peuplier, Chibani et al. indiquent que la Méthionine Sulfoxide Reductase B2 (MSRB2) chloroplastique est cible de la TRX z.

Lors de la recherche du système de réduction de la TRX z, la NTRC, bien que très peu efficace, présente la capacité de réduire la TRX z. Afin d'apporter une validation fonctionnelle à ce résultat, la capacité de la NTRC à réduire la TRX z a alors été étudiée *in vitro* en utilisant la MSRB2 comme accepteur final d'électrons.

Le but ici est de forcer le système de transfert des électrons allant du NADPH et de la NTRC à la MSRB2 *via* la TRX z. Ainsi, du fait de la présence de son substrat en excès, le MetSO, la MSRB2 attire les électrons vers elle dans le but d'être réduite, pour ensuite réduire le MetSO. De ce fait, le système NTRC/TRX z doit fonctionner efficacement et en continu pour permettre la réduction de la MSRB2. Ainsi, si la TRX z est effectivement réduite par la NTRC, cela entraîne la consommation du NADPH qui fournit le pouvoir réducteur à la NTRC. C'est donc la consommation du NADPH qui a été suivie spectrophotométriquement à 340 nm ; la consommation du NADPH reflète ici directement l'activité réductase de la NTRC.

Dans ce système, pour des concentrations variables en NTRC (de 20 nM à 2 μ M), la consommation de NADPH ne varie pas au cours du temps. Cela indique donc que le transfert des électrons de la NTRC à la MSRB2 n'est pas efficace, voire inexistant. Cela confirme bien que la NTRC n'est pas capable de réduire efficacement la TRX z.

2) Test d'activation et d'inhibition de la G6PDH par la TRX z

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH1), enzyme clé du cycle oxydatif des pentoses phosphate, peut être inhibée par réduction ou activée par oxydation. L'activité de l'isoforme chloroplastique de cette enzyme, la G6PDH1, est strictement régulée par les thiorédoxines plastidiales (Née et al., 2009). Plus particulièrement, les TRX f1, m1 et m4 sont les thiorédoxines les plus efficaces dans la régulation, par réduction et par oxydation, de l'activité de l'enzyme tandis que la TRX x en est incapable. La TRX y1, quant à elle, est

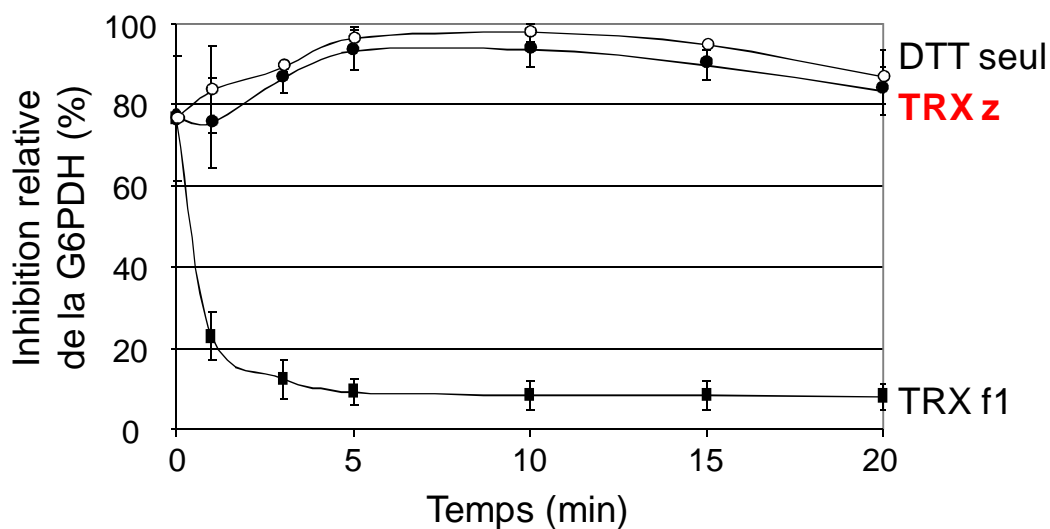
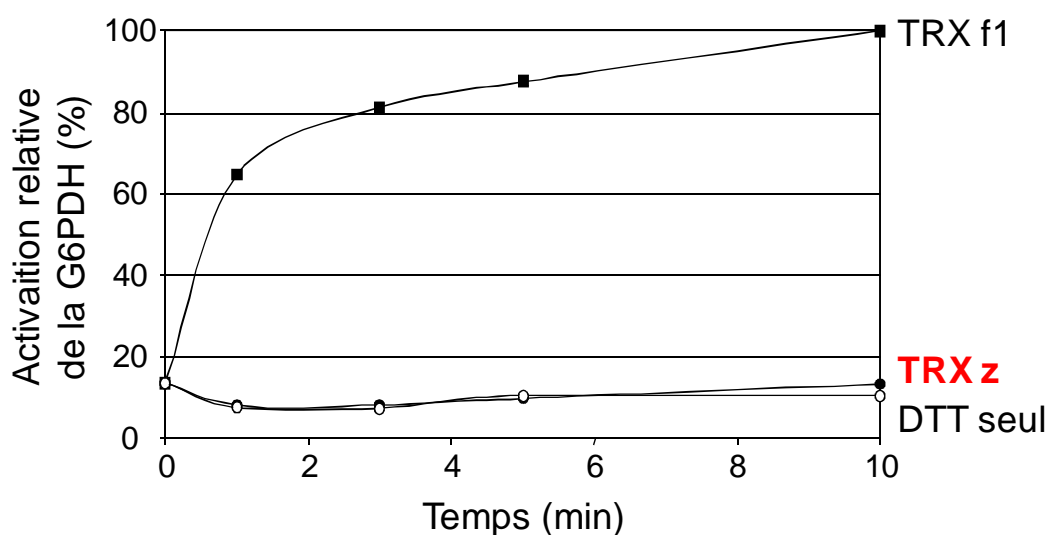
A**B**

Figure 52 : Inhibition (A) et activation (B) de la G6PDH1 en présence ou non de TRX.

A, L'inhibition par réduction de la G6PDH pré-oxydée est réalisée en présence de TRX f1 (témoin positif) ou de TRX z (1 μ M) et de DTT_{red} 1 mM ; B, L'activation par oxydation de la G6PDH pré-réduite est réalisée en présence de TRX f1 (témoin positif) ou de TRX z (10 μ M) et de DTT_{ox} 10 mM. Dans les deux cas, l'activité de l'enzyme est mesurée en présence de DTT seul (contrôle négatif).

incapable d'inhiber par réduction l'enzyme mais est aussi efficace que la TRX f1 dans le processus d'activation par oxydation de l'enzyme.

La capacité de la TRX z à réguler l'activité de la G6PDH1 par réduction et par oxydation a été testée.

Lorsque la G6PDH1 oxydée est incubée en présence de TRX f1 réduite, l'activité de l'enzyme est fortement inhibée et atteint un plateau dès 10 minutes (Figure 52 A). En présence de TRX f1 oxydée, l'activité de la G6PDH1 réduite est augmentée (Figure 52 B) ce qui est en adéquation avec les résultats de Née et al. (2009).

Dans les mêmes conditions, lorsque la G6PDH1 oxydée est incubée en présence de TRX z pré-réduite, et de façon similaire à ce qui est observé en présence de DTT seul, l'activité de l'enzyme n'est pas modifiée (Figure 52 A). Il en est de même lorsque la G6PDH réduite est incubée en présence de TRX z oxydée (Figure 52 B). Cela indique que la TRX z n'a pas la capacité de réguler la G6PDH1.

Cependant, la concentration en DTT_{red} (1 mM) utilisée lors du test de réduction de la G6PDH1 est trop faible pour permettre la réduction complète de la TRX z. De ce fait, il serait intéressant de mesurer l'inhibition par réduction de la G6PDH1 en présence de TRX z réduite au préalable par 100 mM de DTT_{red}.

3) Test de réduction de l'insuline par la TRX z

Parmi les nombreuses cibles connues des thiorédoxines plastidiales testées jusqu'à présent, seule la régulation de l'activité de la 2-Cys PRX par la TRX z a été mise en évidence. De ce fait, le test de réduction de l'insuline par la TRX z a été réalisé.

Ce test est communément utilisé afin de valider l'activité réductase des thiorédoxines. En effet, l'insuline est composée de deux chaînes (α et β) liées entre elles par un pont disulfure. Lorsque l'insuline est réduite, par le DTT ou par une thiorédoxine (Holmgren, 1979), la chaîne β est libérée, ce qui entraîne sa précipitation. La précipitation de l'insuline entraîne un changement de la turbidité du milieu de réaction, ce changement pouvant être suivi spectrophotométriquement à 650 nm (test turbidimétrique).

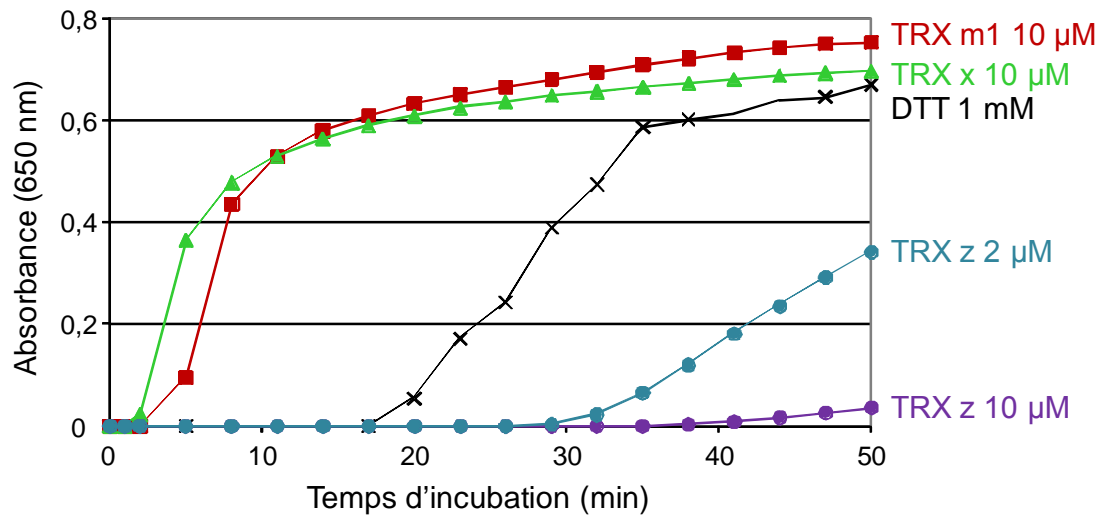
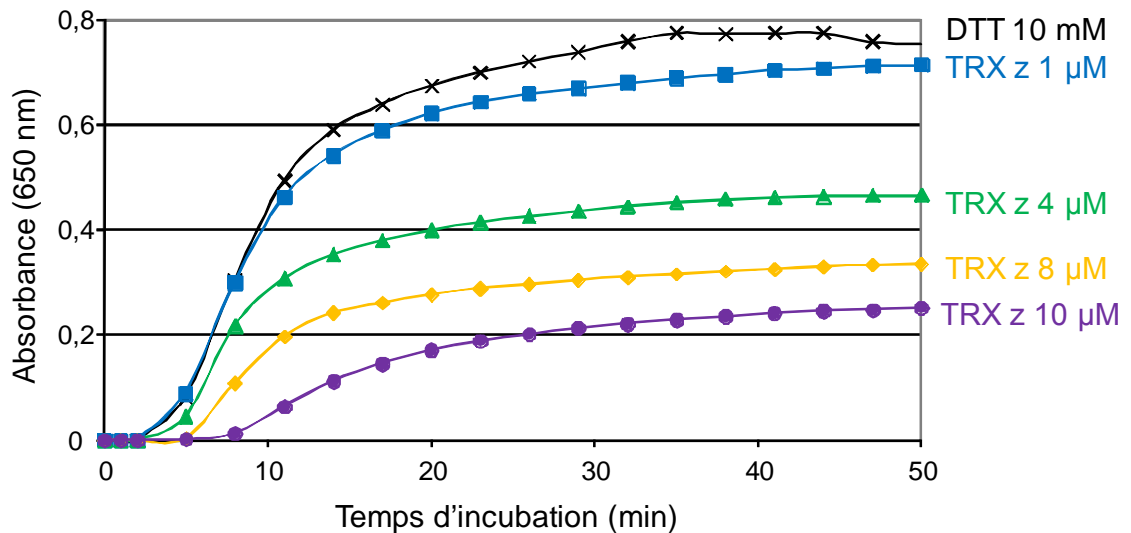
A**B**

Figure 53 : Test turbidimétrique de réduction de l'insuline par la TRX z recombinante non étiquetée.

A, La réduction de l'insuline en présence de DTT_{red} 1 mM seul (contrôle négatif) et en présence de TRX m1 et x (10 μ M, témoins positifs) ou de TRX z (2 μ M et 10 μ M) a été mesurée spectrophotométriquement à 650 nm ; B, De la même façon, la réduction de l'insuline en présence de DTT_{red} 10 mM et de concentrations variables en TRX z a été mesurée.

La Figure 53 A montre qu'en présence de TRX m1 ou de TRX x, on peut observer que l'absorbance à 650 nm augmente seulement quelques minutes après le début de l'incubation, traduisant une augmentation de la turbidité du milieu réactionnel. Il y a donc une réduction efficace de l'insuline par ces deux thiorédoxines plastidiales. On peut également noter que le DTT, bien qu'à une concentration faible de 1 mM, est capable de réduire l'insuline, la réaction se faisant néanmoins beaucoup plus lentement qu'en présence de thiorédoxine. En revanche, en présence de 10 μ M de TRX z non étiquetée, la réduction de l'insuline est très faible. La TRX z est même moins efficace pour réduire l'insuline que le DTT seul. Cependant, lorsque la concentration en TRX z est cinq fois moins importante (2 μ M) la réduction de l'insuline est plus efficace (Figure 53 A).

Du fait de la difficulté à réduire chimiquement la TRX z, le test a été réalisé en présence d'une concentration en DTT plus importante (10 mM au lieu de 1 mM). De ce fait, bien qu'incomplète, la réduction de la TRX z sera plus importante et ainsi, sa capacité à réduire l'insuline sera certainement améliorée. Tout d'abord, il apparaît clairement qu'en présence de 10 μ M de TRX z non étiquetée, la réduction de l'insuline est bien moins efficace qu'en présence de DTT seul (Figure 53 B). Par ailleurs, lorsque la concentration en TRX z diminue, la réduction de l'insuline augmente à nouveau, celle-ci étant néanmoins plus faible qu'en présence de DTT seul. Il est donc clair que la TRX z est incapable de réduire l'insuline. Ce même résultat a par ailleurs été obtenu en présence de TRX z recombinante étiquetée. La TRX z n'est donc pas une réductase efficace pour l'insuline. Il apparaît également que l'ajout de concentrations croissantes en TRX z inhibe l'effet réducteur du DTT.

La question est ici de savoir si la TRX z a un effet inhibiteur sur l'action du DTT ou si la TRX z joue un rôle protecteur sur l'insuline vis-à-vis du DTT. En effet, la TRX z pourrait interagir avec l'insuline, potentiellement *via* des liaisons électrostatiques, freinant ainsi l'accès du DTT au pont inter-moléculaire de l'insuline. Ce qui est certain, à la vue de ces résultats, c'est qu'à nouveau, le comportement de la TRX z se distingue de celui des autres thiorédoxines.

Jusqu'alors, il a été possible de montrer que la TRX z est capable de jouer le rôle de substrat réducteur pour la 2-Cys PRX, au même titre que les TRX de types x et y. Néanmoins, l'efficacité de la TRX z vis-à-vis de cette enzyme est cinq fois moindre que celle de la TRX x. Ainsi, bien que peu efficace dans son rôle de substrat réducteur, nous avons tout de même

été en mesure de valider que la TRX z recombinante était fonctionnelle et qu'elle présente une capacité d'oxydoréductase de ponts disulfure.

La TRX z n'ayant aucun effet réducteur sur les autres cibles disponibles au laboratoire testées, il semblait important de trouver quelle(s) cible(s) pouva(en)t être régulée(s) efficacement et spécifiquement par la TRX z.

V. Recherche de cibles spécifiques de la TRX z

Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai entrepris la recherche des protéines cibles putatives de la TRX z. Pour ce faire, deux approches complémentaires ont été employées :

- une recherche de cibles par une approche *in vitro* par chromatographie d'affinité sur colonne de TRX z, couplée à une identification par spectrométrie de masse. J'ai réalisé ce travail en collaboration avec Paulette Decottignies au sein de son équipe « Pharmacologie et biochimie de la synapse » (IBBMC, Orsay).
- une recherche de cibles par une approche *in vivo* par criblage double hybride en système levure. Pour ce travail, j'ai eu l'occasion de me rendre à l'Institut de Recherche et de Développement (IRD) de Montpellier pendant plusieurs mois où j'ai pu travailler avec Florence Vignols.

A. Recherche de cibles de la TRX z par une approche *in vitro*

Lors du travail de purification de la TRX z non étiquetée, nous avons pu mettre en évidence que la TRX z a une forte capacité à former des complexes protéiques de masse moléculaire élevée. De plus, il est clairement apparu que la TRX z se liait à ses partenaires par des liaisons électrostatiques fortes.

Cette propriété de la TRX z à interagir facilement avec d'autres protéines *via* des liaisons électrostatiques a été utilisée pour entreprendre la recherche de cibles. Par ailleurs, jusqu'ici, les recherches de cibles par approche protéomique utilisant d'autres thiorédoxines ont généralement été réalisées sur des colonnes monocystéiniques de thiorédoxine. Le principe de ce type de colonne est de muter le deuxième résidu cystéine du site actif de la thiorédoxine d'intérêt dans le but de bloquer l'interaction entre la thiorédoxine et sa cible potentielle lors de la formation du pont disulfure mixte entre elles. Bien que très utilisée, cette approche a récemment souligné la non-spécificité des cibles identifiées. Il a en effet été suggéré qu'il s'agit là davantage d'une modification post-traductionnelle de la cible,

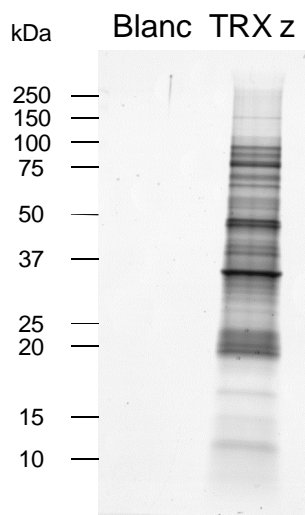
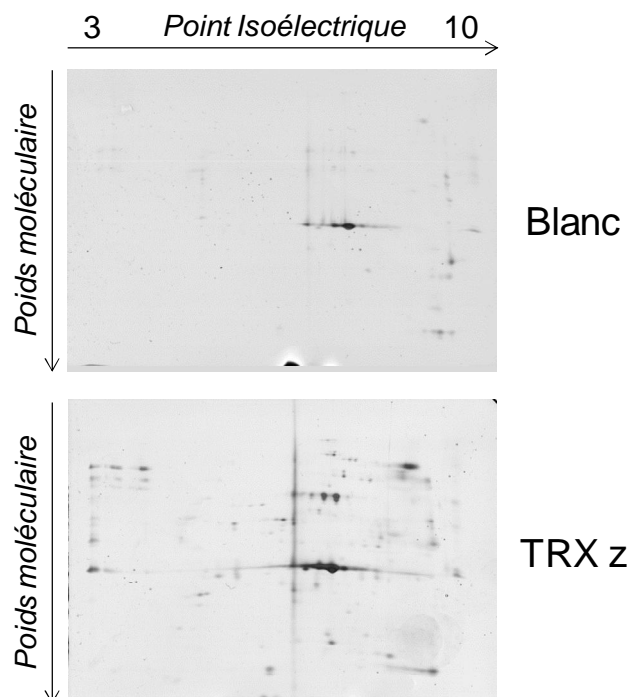
A**B**

Figure 54 : Analyse sur gel SDS-PAGE des protéines éluées, cibles potentielles de la TRX z.

Les protéines éluées de la colonne de TRX z ont été analysées sur gel SDS-PAGE à une dimension (A, séparation des protéines selon la masse moléculaire) ou sur gel SDS-PAGE à deux dimensions (B, séparation des protéines selon le point isoélectrique et selon la masse moléculaire) et colorées au nitrate d'argent. La fraction éluee de la colonne témoin sans TRX z correspond au « Blanc ».

impliquant une interaction de type redox, qu'une spécificité réelle de la cible vis-à-vis de la rédoxine utilisée (thiorédoxine ou glutarédoxine). Un groupement thiol libre accessible d'une protéine pourrait réagir avec le résidu cystéine catalytique de la rédoxine, permettant de retenir la protéine sur la colonne, sans que celle-ci soit pour autant une cible spécifique de la rédoxine étudiée.

Pour toutes ces raisons, une recherche de cibles par chromatographie d'affinité sur une colonne de TRX z native dont le deuxième résidu cystéine du site actif n'est pas muté a été entreprise. De plus, une élution des protéines cibles putatives de la TRX z au NaCl 0,5 M et non au DTT, a été privilégiée. Cela permet ainsi de déstabiliser les interactions électrostatiques entre la TRX z et son partenaire. Une telle approche a été utilisée pour une recherche de partenaires de la TRX f1, permettant ainsi d'identifier 27 nouvelles cibles potentielles de cette thiorédoxine (Balmer et al., 2004).

Par ailleurs, lorsque ce travail a été initié, nous avons montré que la TRX z ne pouvait être réduite par le système FTR à la lumière. La possibilité que la TRX z joue son rôle à l'obscurité et non à la lumière paraissait alors possible ; de ce fait, nous avons choisi d'entreprendre la recherche de cibles de la TRX z sur des extraits foliaires de plantes à l'obscurité. Ainsi, les échantillons ont été récoltés en fin de période de nuit, une heure avant la reprise de la phase de lumière. De plus, jusqu'à présent, les recherches de cibles de thiorédoxines dans les tissus photosynthétiques n'ont été réalisées que sur des tissus prélevés à la lumière. Les métabolismes de plantes à la lumière et de plantes à l'obscurité étant très différents, il apparaissait ainsi plus probable d'identifier des cibles nouvelles de thiorédoxines et, plus particulièrement, spécifiques de la TRX z.

Les protéines éluées, cibles potentielles de la TRX z, ont été analysées sur gels SDS-PAGE à une et deux dimensions, puis colorées au nitrate d'argent (Figure 54 A et Figure 54 B respectivement). Les protéines ont ensuite été extraites du gel et préparées en vue de l'analyse par spectrométrie de masse (voir détails dans la section « Matériels & Méthodes »). Les résultats d'identification sont présentés dans le Tableau 12 et leur analyse est présentée à la fin de cette partie.

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
Processus métaboliques				
RuBisCO large chain	AtCg00490	Q03042	Chloroplastes	
D-mannose-binding lectin-like protein	At1g78830	Q9ZVA2	Paroi cellulaire	Protéines impliquées dans la liaison des sucres
D-mannose-binding lectin protein	At1g78820	Q9ZVA4	Paroi cellulaire	
Alpha-xylosidase(XYL1)	At1g68560	Q9S7Y7	Paroi cellulaire	Protéine impliquée dans le métabolisme des xyloglucanes
Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	At3g12780	Q9LD57	Chloroplastes	Impliquée dans la régulation d'enzymes du cycle de Calvin (S-nitrosylation)
Phosphoglycerate kinase 2	At1g56190	P50318	Chloroplastes	Kinase impliquée dans la régulation d'enzymes du Cycle de Calvin
RuBisCO small chain 2B/chain3B	At5g38410 At5g38420	P10798 P10797	Chloroplastes	
RuBisCO small chain 1A	At1g67090	P10795	Chloroplastes	
RuBisCO small chain 1B	At5g38430	P10796	Chloroplastes	
Beta-galactosidase 10	At5g63810	Q9FN08	Apoplaste	Enzyme du métabolisme carboné. Réponse à la karrikin.
RuBisCO activase	At2g39730	P10896	Chloroplastes	Protéine responsable de l'activation de la RuBisCO Impliquée dans les réponses de défenses au pathogènes
3R-hydroxymyristoyl ACP dehydrase	At2g22230	Q9SIE3	Chloroplastes Paroi cellulaire	Intervient dans la biosynthèse des acides gras et en réponse à une attaque fongique
Heparanase-like protein 1	At5g07830	Q9FF10	Membrane plasmique	Endoglycosidase responsable de la dégradation des parois cellulaires
Indole-3-butyric acid response 10 (dl3255c)	At4g14430	Q23299	Peroxisome	Enzyme impliquée dans le catabolisme des acides gras. Rôle putatif au cours de l'élongation racinaire.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (GAPDH B)	At1g42970	P25857	Chloroplastes	Enzyme du cycle de Calvin qui catalyse la formation du 3-phosphoglyceroyl phosphate à partir du glyceraldéhyde 3-phosphate (GAP)

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
Processus métaboliques (suite)				
Putative subtilisin serine protease	At2g05920	Q9ZUF6	Paroi cellulaire	Fonction inconnue
GDSL esterase/lipase	At1g29670	Q9C7N4	Paroi cellulaire Chloroplastes	Protéine impliquée dans le catabolisme des lipides
Beta-galactosidase 6 (BGAL6)	At5g63800	Q9FFN4	Paroi cellulaire	Glycoprotéine impliquée dans la formation du mucilage des semences
Alpha-glucosidase 1 (T22P22)	At5g11720	Q9LYF8	Paroi cellulaire	Enzyme impliquée dans le métabolisme carboné. Fonction inconnue.
(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase 2 (T31P16_150)	At5g10160	Q9LX13	Chloroplastes Paroi cellulaire	Intervient dans la biosynthèse des acides gras
GDSL esterase/lipase	At4g01130	Q9M153	Paroi cellulaire	Protéine impliquée dans le catabolisme des lipides
Thioredoxin f1 (TRX f1)	At3g02730	Q9XFH8	Chloroplastes	Régulation des enzymes du Cycle de Calvin
Subtilisin-like protease (ARA12)	At5g67360	Q65351	Paroi cellulaire	Sérine protéase impliquée dans la formation du mucilage des graines
Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1 (GLU1)	At5g04140	Q9ZN77	Chloroplastes Cytosol	Photorespiration et assimilation de l'azote. Expression induite par la lumière et les sucres dans les feuilles.
Leucine-rich repeat-like protein	At1g49750	Q9FXA1	Chloroplastes, membrane plasmique	Impliquée dans les réponses cellulaires induites suite à une carence en azote
Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 25 (PME25)	At3g10720	Q94CB1	Paroi cellulaire	Protéine impliquée dans la modification de la paroi cellulaire (demethylesterification de la pectine)
Malate dehydrogenase 1	At1g53240	Q9ZP06	Mitochondries	Protéine impliquée dans le cycle de l'acide tricarboxylique au cours de la respiration aérobie
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH C)	At3g04120	P25858	Cytosol	Enzyme impliquée dans la glycolyse

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
Processus métaboliques (suite)				
Putative subtilisin-like serine proteinase	At3g14067	Q9LVJ1	Paroi cellulaire	Fonction inconnue
Détoxication des ROS				
Peroxiredoxin Q (PRXQ)	At3g26060	Q9LU86	Chloroplastes	Impliquée dans la protection de la machinerie photosynthétique contre le peroxyde d'hydrogène
Reticuline oxidase-like protein	At4g20830	Q9SVG4	Vacuole, mitochondries	Protéine à domaine FAD impliquée dans la réponse aux stress oxydants
2-Cys peroxiredoxin (2-Cys PRX, BAS1)	At5g06290	Q9C5R8	Chloroplastes	Enzyme de détoxication du peroxyde d'hydrogène jouant un rôle dans la protection du chloroplaste contre les stress oxydatifs
Thylakoid lumenal 29 kDa protein (TL29)	At4g09010	P82281	Chloroplastes	Putative oxidoréductase impliquée dans la réponse aux stress oxydatifs
Thioredoxin-like protein CITRX, TRX z	At3g06730	Q9M7X9	Chloroplastes	Donneur d'électrons à la 2-Cys PRX
Catalase 3 (CAT3)	At1g20620	B9DG18	Cytosol, chloroplastes	Enzyme impliquée dans la détoxication du peroxyde d'hydrogène et la régulation de la voie du jasmonate
DNA/RNA binding				
Chloroplast stem-loop binding protein CSP41B	At1g09340	Q9SA52	Chloroplastes	Impliquées dans la stabilisation du complexe de l'ARN polymérase plastidiale. Protéine dont l'expression suit le rythme circadien.
5-methyltetrahydropteroyl triglutamate-homocysteine methyltransferase (CIMS)	At5g17920	Q50008	Cytosol	Enzyme impliquée dans la formation de la méthionine

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
DNA/RNA binding (suite)				
Putative chloroplast RNA binding protein	At2g35410	Q82299	Chloroplastes (stroma, thylacoïdes)	Protéine intervenant dans la mise en place des thylacoïdes, la biosynthèse de la chlorophylle
ssDNA binding transcriptional regulator	At2g02740	A8MR64	Chloroplastes, noyau	Fonction inconnue
RNA polymerase B transcription factor 3	At1g73230	Q9CAT7		Réponse au stress salin
Basic Transcription Factor 3 (BTF3)	At1g17880	Q9SMW7		Réponse au stress salin
Chloroplast stem-loop binding protein CSP41A	At3g63140	Q9LYA9	Chloroplastes	Impliquées dans la stabilisation du complexe de l'ARN polymérase plastidiale. Protéine dont l'expression suit le rythme circadien.
Putative DNA-binding protein p24 Plastid Transcriptionally Active 1 (PTAC1)	At1g14410	Q9M9S3	Chloroplastes	Protéine à domaine de liaison à l'ADN, intervient dans la régulation négative du maintien des télomères
RNA recognition protein	At4g09040	A8MS54	Chloroplastes, noyau	Fonction inconnue
Aspartyl protease-like protein (Nucleoid DNA-binding-like protein)	At1g09750	Q04496	Paroi cellulaire	Fonction inconnue
Adenosylhomocysteinase 1 (SAHH1)	At4g13940	Q23255	Cytosol	Intervient dans la régulation de la concentration en adenosylhomocystéine. Protéine requise pour la méthylation de l'ADN.
Chloroplast RNA-binding protein 33	At3g52380	Q39061	Chloroplastes	Fonction inconnue

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
DNA/RNA binding (suite)				
Putative tryptophanyl-tRNA synthetase (OVULE ABORTION 4, OVA4)	At2g25840	Q8RXE9	Chloroplastes, mitochondries	Protéine impliquée dans le développement des ovules
Putative formyltransferase	At1g66520	Q9C712	Cytosol	Impliquée dans l'initiation de la traduction
Réponses de défense de la plante lors de stress (a)biotiques				
Leucine-rich repeat-containing protein	At1g33600	Q9FW48	Paroi cellulaire	Impliquée dans la régulation négative des réponses de défense suite à une attaque pathogène
Myrosinase 2 (TGG2)	At5g25980	Q9C5C2	Vacuole, cytosol	Catalyse l'hydrolyse des glucosinolates en composés toxiques pour les herbivores et les microbes
Myrosinase 1 (TGG1)	At5g26000	P37702	Vacuole, cytosol	Catalyse l'hydrolyse des glucosinolates en composés toxiques pour les herbivores et les microbes
Serine hydroxymethyltransferase 1 (SHM1)	At4g37930	Q9SZJ5	Mitochondries	Protéine catalysant la conversion de la sérine en glycine Impliquée dans les processus de réparation de la cellule (stress biotiques et abiotiques)
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1	At3g12390	Q9LHG9	Cytosol	Protéine de transport impliquée dans les réponses au stress salin
Cysteine-rich repeat secretory protein 55 (CRRSP55)	At5g48540	Q9LV60	Paroi cellulaire	Protéine impliquée dans la réponse à la karrikin, composé présent dans la fumée des végétaux en feu
3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (PED1)	At2g33150	Q56WD9	Peroxisome	Enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras au cours de la germination et la biosynthèse du jasmonate après une blessure
3-ketoacyl-CoA thiolase 1 (KAT1)	At1g04710	Q8LF48	Peroxisome	
Aspartyl protease-like protein	At1g03230	Q9ZVS5	Paroi cellulaire	Impliquée dans la réponse au stress salin
Germin-like protein subfamily 3 member 3 (GER3)	At5g20630	P94072	Apoplaste	Protéine dont l'expression est rythmée lors du cycle circadien. Rôle putatif dans les réponses de défense.

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
Réponses de défense de la plante lors de stress (a)biotiques (suite)				
Vegetative storage protein 2 (VSP2)	At5g24770	Q82122	Vacuole	Protéine de stockage impliquée dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques
Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme 2 (LFNR2)	At1g20020	Q8W493	Chloroplastes	Protéine impliquée dans la régulation du transport d'électrons au cours de la photosynthèse. Rôle potentiel dans la réponse aux stress biotiques.
Putative proline-rich protein OU Arabinogalactan protein 31 (AGP31) (87% d'identité)	At1g28290	Q0WP47 Q9FZA2	Membrane plasmique	Expression dépendante du jasmonate
Autres				
Putative uncharacterized protein T1E4.3	At1g33590	Q9FW47	Paroi cellulaire, chloroplastes	Fonction inconnue
Aspartyl protease family protein	At3g54400	Q9M2U7	Paroi cellulaire Chloroplastes	
Cell cycle-related nuclear binding protein (AtG2)	At3g51800	Q96327	Noyau, cytosol	Fonction inconnue
Unknown protein (Cupredoxin?)	At5g21105	Q94A37	Paroi cellulaire	Protéine présentant une activité oxidoréductase. Domaine de liaison au cuivre.
Oxygen-evolving enhancer protein 3-1 (PSBQ1)	At4g21280	Q9XFT3	Chloroplastes	Protéine associée au photosystème II, requise pour l'assemblage et la stabilité de ce dernier
Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein (ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM 1, AIM1)	At4g29010	Q9ZPI6	Peroxisome	Protéine impliquée dans l'oxydation des acides gras Rôle potentiel au cours du développement floral

Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation	Rôle
Autres				
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 (NMT1)	At5g57020	Q9LTR9	Cytosol	Impliquée dans les processus de myristoylation des protéines
Vegetative storage protein 1 (VSP1)	At5g24780	Q49195	Vacuole	Protéine de stockage
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 4	At4g10480	Q9SZY1	Cytosol	Protéine de transport. Fonction inconnue.
DnaQ-like 3'-5' exonuclease domain-containing protein	At3g11770	Q9SF21	Vacuole	Fonction inconnue
Phosphorylase family protein	At4g24350	Q94K59	Paroi cellulaire	Fonction inconnue
Aspartyl protease-like protein	At1g79720	Q8RX60	Paroi cellulaire	Fonction inconnue
Non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP1)	At2g38540	Q42589	Paroi cellulaire	Protéine impliquée dans le transfert des phospholipides et des galactolipides au travers des membranes
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2 (PSBQ2)	At4g05180	Q41932	Chloroplastes	Protéine associée au photosystème II, requise pour l'assemblage et la stabilité de ce dernier
Growth regulator like protein OU Heat shock 70 kDa protein 17 (HSP70-17)	At4g16650 At4g16660	Q23508 F4JMJ1	Reticulum Endoplasmique	Fonctions inconnues
Putative NADPH quinone oxidoreductase	At4g21580	A8MRW5	Inconnue	Fonction inconnue

Tableau 12 : Cibles potentielles de la TRX z identifiées par approche protéomique in vitro sur colonne d'affinité de TRX z native.
 Les cibles sont classées selon la proportion de peptides identifiés lors de l'analyse par spectrométrie de masse (ordre décroissant).

B. Recherche de cibles de la TRX z par une approche *in vivo*

Au cours de ce travail, une souche de levure spécialement destinée à la recherche et l'identification de protéines cibles d'une thiorédoxine a été utilisée. En effet, la souche CY306 est une souche de levure déficiente en thiorédoxines endogènes ($\Delta trx1\Delta trx2$) (Vignols et al., 2005) permettant ainsi l'identification de protéines cibles spécifiques de la TRX z.

Pour cette recherche de cibles, deux appâts ont été utilisés. D'une part, la forme chloroplastique maturée de la thiorédoxine z (TRX z – WT) et d'autre part, la forme chloroplastique maturée et mutée sur le deuxième résidu cystéine du site actif WCGPC de la thiorédoxine z (TRX z – C109S). Dans le cas de la régulation redox de la cible, on peut supposer que la mutation du site actif entraînera la stabilisation du pont disulfure mixte formé entre la thiorédoxine z et sa cible, facilitant alors l'import du complexe au noyau et la transcription du gène rapporteur.

Pour chacun des criblages, plusieurs cibles potentielles de la TRX z ont été identifiées et sont résumés dans le Tableau 13 et détaillés ci après.

1) Cibles identifiées en utilisant la TRX z sauvage non mutée comme appât (appât TRX z – WT)

- Class II chitinase-like protein

Cette enzyme, localisée au niveau de la paroi cellulaire, est apparentée à la super famille des chitinases, impliquées dans les réponses de défense aux champignons. Ces enzymes sont plus particulièrement impliquées dans les processus d'hydrolyse de la paroi des champignons pathogènes. Seule une recherche de cibles de la thiorédoxine h dans des graines d'orge avait permis l'identification d'endochitinases, homologues à la chitinase 3 du blé, suggérant ainsi un rôle de la thiorédoxine h dans la régulation redox de protéines de défense (Maeda et al., 2004).

- RuBisCO

Il s'agit ici de la petite sous-unité 3B qui contient cinq résidus cystéine. Diverses approches protéomiques ont permis d'identifier la petite et la grande sous-unité comme cibles des thiorédoxines. Néanmoins, la RuBisCO n'a jusqu'à présent jamais été identifiée lors d'un criblage double hybride utilisant une thiorédoxine comme appât. Cependant, la régulation redox de la RuBisCO par les thiorédoxines, bien qu'étudiée, n'a pas été démontrée. Seule l'activation de la RuBisCO activase par les TRX a été expérimentalement prouvée (Zhang and Portis, 1999).

- Zinc finger protein STZ/ZAT10

Ce facteur de transcription nucléaire, qui contient six résidus cystéines dans sa séquence, n'a jamais été identifié auparavant comme cible des thiorédoxines. Il est connu que le niveau de transcrits de ZAT10 est induit en réponse aux stress biotiques et abiotiques. Récemment, il a d'ailleurs été montré que ZAT10 est substrat des MAP kinases 3 et 6 (Nguyen et al., 2012). Les auteurs suggèrent que la phosphorylation directe de ZAT10 par ces kinases permettrait ainsi d'induire des réponses physiologiques de défense face à divers stress.

- Farnesyltransférase A

Cette enzyme cytosolique est responsable de la prénylation de protéines cibles, mécanisme qui consiste à incorporer un résidu farnésyl sur un résidu cystéine de protéines cibles portant le motif CnnX en position C-terminale. Du fait de la forte hydrophobicité du résidu incorporé, cette modification post-traductionnelle provoque une relocalisation de la protéine cible, qui se trouve alors associée à la membrane (Novelli and D'Apice, 2012).

2) Cibles identifiées en utilisant la TRX z mutée sur le deuxième résidu cystéine du site actif comme appât (appât TRX z – C109S)

- TRX z thioredoxin-like protein CITRX

La forme mature mutée a permis d'identifier comme cible la forme native non maturée (pré-protéine avec son peptide d'adressage) de la TRX z. L'identification de la TRX z non maturée comme cible apporte une troisième confirmation expérimentale, en plus des tests biochimiques et des tests binaires en levure, que la TRX z est capable d'interagir avec elle-même, ce qui peut alors éventuellement aboutir à la formation de complexes multimériques de TRX z.

- Histone H3

L'histone H3 est une des quatre histones qui, en complexe avec l'ADN, sont impliquées dans la formation du nucléosome dans le noyau. Parmi les modifications post-traductionnelles connues de cette protéine, il y a sa méthylation sur le résidu Lysine 9 qui entraîne la condensation de la chromatine, permettant ainsi de réguler l'expression des gènes (Kouzarides, 2007). L'histone H3 présente un unique résidu cystéine au sein de sa séquence. Cela indique que la régulation redox de l'histone H3 est peu probable. Si son interaction avec la TRX z est confirmée, l'étude de processus n'impliquant pas une régulation d'oxydoréduction devrait être privilégiée.

- ESM1 epithiospecifier modifier 1

Le gène Epithiospecifier Modifier 1 (*ESM1*) code une protéine appartenant à une classe de protéines associées aux myrosinases. Des analyses protéomiques ont permis de localiser cette protéine dans les chloroplastes mais également au niveau de la membrane plasmique et de la vacuole. *ESM1* intervient dans la voie de dégradation des glucosinolates, métabolites secondaires qui, lors d'une attaque herbivore et/ou pathogène, sont hydrolysés en nitriles ou isothiocyanate. Plus spécifiquement, la production de ces composés est dépendante d'un complexe protéique qui implique une myrosinase, *ESP* (Epithiospecifier protein) et *ESM1* (Zhang et al., 2006; Burow et al., 2008). Cette voie est caractéristique des crucifères.

ESM1 n'a jamais été identifié auparavant comme cible des thiorédoxines. Cependant, il a été montré que la myrosinase qui y est associée est une cible potentielle des thiorédoxines (Marchand et al., 2004).

- VSP2 Vegetative Storage Protein 2

La protéine VSP2, localisée principalement dans les vacuoles, est impliquée dans des mécanismes de réponses aux stress (blessures, stress oxydants, stress salin, réponse au cuivre, au méthyl-jasmonate,...). Par homologie à ce qui a été montré chez le soja en réponse à un stress environnemental, chez *Arabidopsis thaliana*, VSP2 s'accumule dans les organes en développement, les cotylédons et les feuilles matures et joue le rôle de protéine de stockage de source azotée suite à une dégradation protéique importante (Utsugi et al., 1998; Mira et al., 2002).

- HEL Hevein-like protein

Cette protéine a été identifiée comme appartenant à la classe I des protéines de défense de type PR-4 (Pathogenesis-related protein 4) (Bertini et al., 2012). La protéine HEL contribue ainsi à la mise en place des mécanismes de défense de résistance en réponse à une attaque pathogène. Cette protéine présente dans sa séquence un domaine de liaison à la chitine et son expression semble régulée par des composés tels que l'éthylène ou l'acide salicylique (Potter et al., 1993).

- TRIP-1 (TGF- β Receptor Interacting Protein 1)

Il a été montré que l'expression du gène codant la protéine TRIP-1 est régulée par les brassinostéroïdes et que la protéine TRIP-1 est phosphorylée *in vitro* par le récepteur kinase BRI1 (Brassinosteroid Insensitive 1) (Jiang and Clouse, 2001; Ehsan et al., 2005). Par ailleurs, TRIP-1 a été identifiée comme une sous-unité du facteur d'initiation de la transcription eIF3 (Burks et al., 2001). Il est donc suggéré que le facteur TRIP-1, lorsqu'il est phosphorylé, s'associe à des facteurs de transcription nucléaires pour réguler l'expression de gènes dépendants des brassinostéroïdes.

- PEX11C (Peroxin 11C)

La protéine PEX11C appartient à une famille de péroxines composée de cinq membres et est localisée au niveau de la membrane du peroxysome. Il a été montré que ces protéines sont impliquées dans la prolifération, l'élongation et la morphologie des peroxysomes, chacune ayant un rôle distinct dans ces processus (Lingard and Trelease, 2006; Orth et al., 2007).

- RuBisCO

L'interaction entre les cibles putatives identifiées par approche *in vivo* et la TRX z devra être confirmée. Pour cela, un test d'interaction binaire en levure entre la cible potentielle et la TRX z devra être réalisé dans le but de valider, pour chaque cible potentielle identifiée, que celle-ci interagit effectivement avec la TRX z, comme cela a été réalisé lors de l'étude de l'interaction TRX z–TRX z. Pour ce faire, dans un premier temps, il sera nécessaire de cloner l'ADNc complet de chaque cible identifiée dans le vecteur d'expression de levure pGAD. Par la suite, des tests d'interaction binaire seront réalisés en utilisant le vecteur d'expression pGBK vide afin de valider que la protéine cible seule ne transactive pas l'expression du gène rapporteur *HIS3*. Dans un second temps, l'interaction entre la cible potentielle et la TRX z pourra être confirmée par cette même approche en utilisant les construits pGBK :: TRX z et pGAD :: TRX z déjà disponibles et les construits pGAD :: cible et pGBK :: cible nouvellement obtenus.

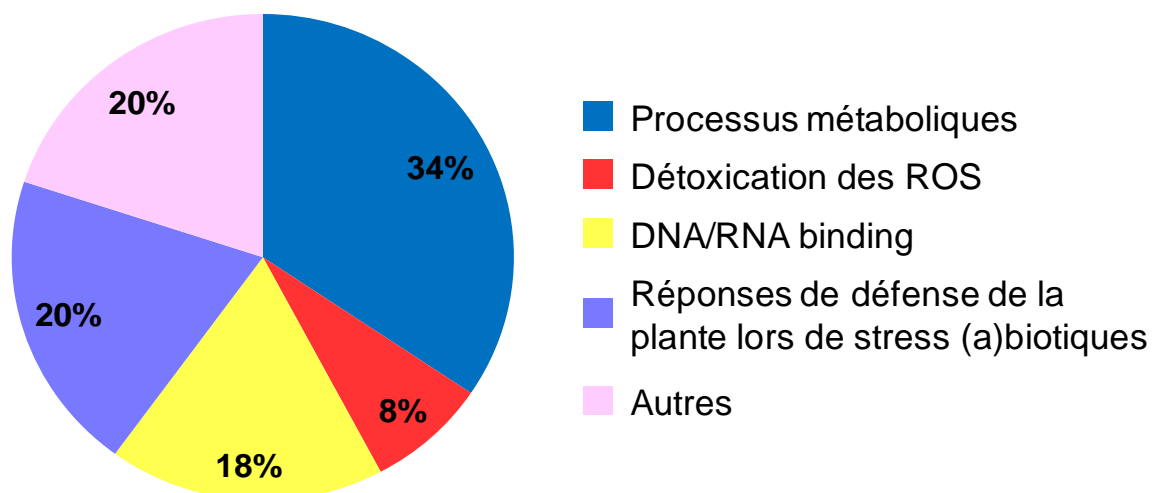
Nom	N° de locus	N° d'accension	Localisation, Rôle connu	Identification
Appât TRX z – WT				
Class II chitinase-like	At4g01700	Q9ZSI6	Paroi, membrane plasmique Réponse de défense aux champignons	Sonde fluorescent spécifique des thiols (Cy5m)
RuBisCO (petite sous-unité)	At5g38410	B3H5S2	Chloroplastes Fixation du carbone	Colonne monocystéinique, co-immunoprécipitation, interactions électrostatiques,...
<i>Zinc finger protein STZ/ZAT10</i>	At1g27730	Q96289	Noyau Réponse aux stress biotiques et abiotiques	Jamais identifiée
<i>Farnesyltransferase A</i>	At3g59380	Q9LX33	Cytosol Relocalisation de protéines cibles	Jamais identifiée
Appât TRX z – C109S				
<i>Thioredoxin-like protein CITRX, TRX z</i>	At3g06730	Q9M7X9	Chloroplastes	Jamais identifiée
<i>Histone H3</i>	At4g40030	A8MRL0	Noyau (nucléosome) Régulation de l'expression des gènes	Jamais identifiée
<i>ESM1 epithiospecifier modifier 1</i>	At3g14210	Q9LJG3	Chloroplastes, membrane plasmique, vacuole Réponse à une attaque herbivore et/ou pathogène	Jamais identifiée
<i>VSP2 Vegetative Storage protein 2</i>	At5g24770	O82122	Vacuole Réponse aux stress biotiques et abiotiques	Jamais identifiée
<i>HEL Hevein-like protein</i>	At3g04720	P43082	Réticulum endoplasmique Protéine de défense de type PR-4 (Pathogenesis-related protein)	Jamais identifiée

<i>TRIP-1</i> <i>(TGF-β Receptor</i> <i>Interacting Protein</i> <i>1)</i>	At2g46280	Q38884	Mitochondries, cytosol Régulation de l'expression des gènes dépendants des brassinostéroïdes	Jamais identifiée
<i>PEX11C</i> <i>Peroxin 11C</i>	At1g01820	Q9LQ73	Peroxysome, mitochondries Prolifération, élongation et morphologie des peroxysomes	Jamais identifiée
RuBisCO (petite sous-unité)	At5g38410	B3H5S2	Chloroplastes	

Tableau 13 : Cibles potentielles de la TRX z identifiées par approche in vivo par criblage double hybride en système levure.

Pour chaque appât utilisé, plusieurs cibles potentielles de la TRX z ont été identifiées. Les cibles de la TRX z, nouvellement identifiées comme cible de thiorédoxine, sont indiquées en italique.

A



B

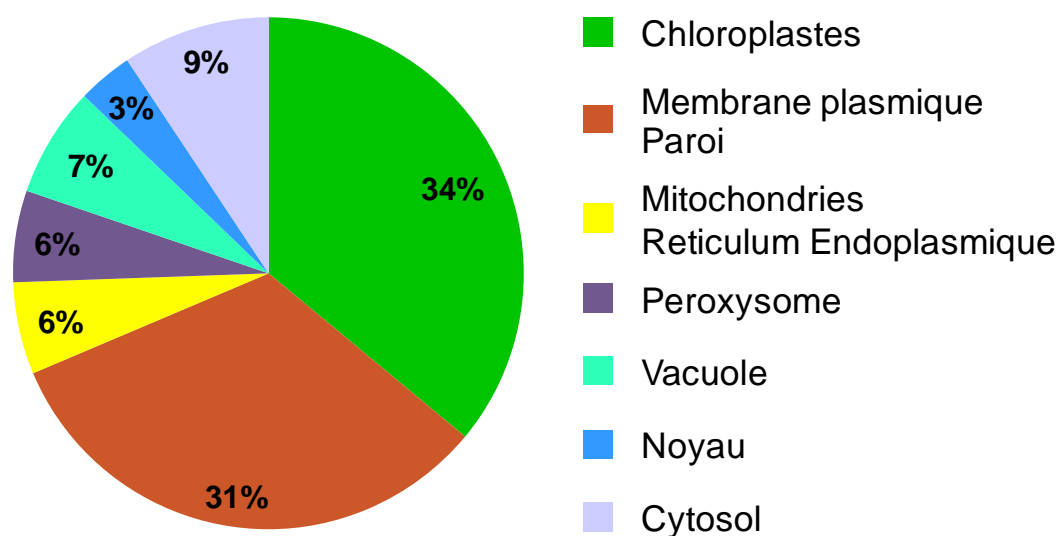


Figure 55 : Fonctions (A) et localisation subcellulaire (B) des protéines cibles putatives de la TRX z identifiées.

C. Analyse des résultats de recherche de cibles putatives de la TRX z

Parmi les 90 cibles de la TRX z identifiées, seules 3 cibles ont été identifiées dans chacune des approches, la TRX z elle-même, la protéine de stockage VSP2 et la petite sous-unité 3B de la RuBisCO, ce qui souligne bien l'aspect complémentaire de ces deux techniques. Par ailleurs, seulement une vingtaine de cibles putatives de la TRX z ont été identifiées auparavant comme cibles de thiorédoxines. Parmi celles-ci, certaines sont des cibles dont la régulation par une ou plusieurs thiorédoxine(s) a été validée expérimentalement telles que la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), la RuBisCO activase, la PRX Q et la 2-Cys PRX, pour laquelle la TRX z peut jouer le rôle de substrat réducteur.

Dans l'ensemble, les cibles putatives identifiées de la TRX z sont impliquées dans la régulation du métabolisme et du catabolisme ; une large proportion de ces cibles est cependant impliquée dans les processus de liaison aux acides nucléiques (ADN et ARN) et de régulation de la transcription et de la traduction. De plus, la TRX z semble être impliquée dans la régulation des stress oxydants mais, surtout, semble intervenir en réponse à des stress abiotiques et/ou biotiques (Figure 55 A). De nombreuses cibles identifiées sont d'ailleurs des protéines qui interviennent dans les voies de signalisation mises en place en réponse à des stress biotiques (herbivore ou pathogène) comme les myrosinases 1 et 2, la catalase 3, les 3-ketoacyl-CoA thiolases 1 et 2 ou la protéine « hevein-like ».

Par ailleurs, il est intéressant de souligner que, bien que la TRX z soit une protéine dont la localisation chloroplastique est démontrée, seulement un tiers de ses cibles putatives identifiées sont localisées dans le chloroplaste (Figure 55 B) et un tiers des cibles sont localisées au niveau de la membrane plasmique ou de la paroi cellulaire. L'identification de la farnesyltransférase A, une protéine qui intervient dans la relocalisation subcellulaire de sa protéine cible, comme cible potentielle de la TRX z soulève la question de savoir si la TRX z peut effectivement être relocalisée vers d'autres compartiments subcellulaires.

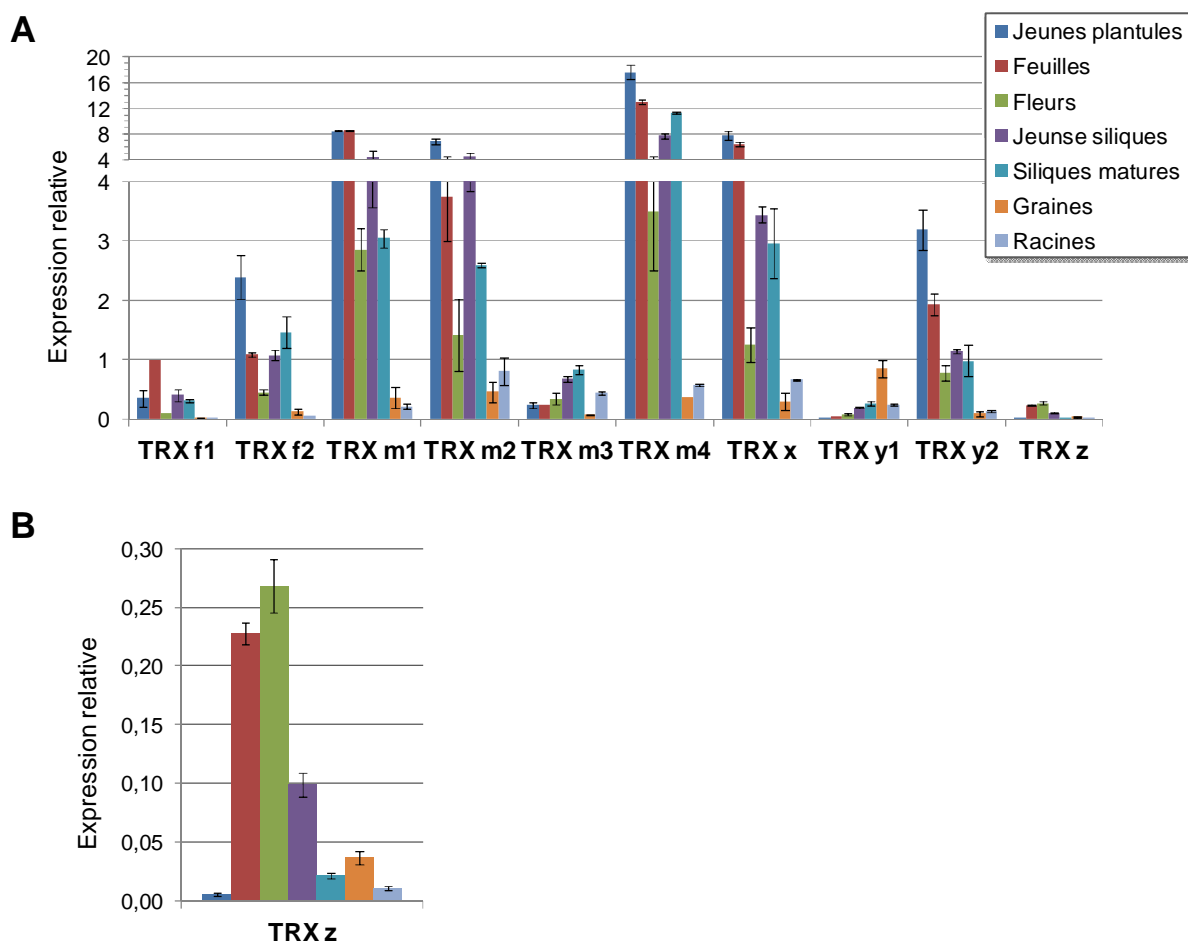


Figure 56 : Analyse de l'expression des thiorédoxines plastidiales dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana*.

L'expression des dix thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis thaliana* (TRX f1, At3g02730 ; TRX f2, At5g16400 ; TRX m1, At1g03680 ; TRX m2, At4g03520 ; TRX m3, At2g15570 ; TRX m4, At3g15360 ; TRX x, At1g50320 ; TRX y1, At1g76760 ; TRX y2, At1g43560 et TRX z, At3g06730) a été analysée par PCR quantitative dans les différents organes de la plante (feuilles, fleurs, jeunes siliques et siliques matures, racines, jeunes plantules et graines). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du gène de référence PP2A.

VI. Caractérisation fonctionnelle de la TRX z

Les données biochimiques obtenues *in vitro* ainsi que les cibles potentielles de la TRX z identifiées par approche protéomique et par criblage double hybride indiquent que cette thiorédoxine plastidiale se distingue des neuf autres isoformes. Dans le but d'approfondir l'étude de la TRX z, sa caractérisation fonctionnelle *in vivo* et *in planta* a été débutée au cours de ma troisième année de thèse. Plusieurs aspects ont été abordés.

A. Analyse de l'expression de la TRX z parmi les autres thiorédoxines plastidiales

1) Expression des thiorédoxines plastidiales dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana*

L'expression des dix isoformes de thiorédoxines plastidiales dans les différents organes de la plante (racine, feuille, jeunes siliques et siliques matures, fleurs, plantule et graines) a été analysée par RT-PCR quantitative. Au cours de sa thèse, Vincent Massot a étudié l'expression des thiorédoxines de types f, m, x et y ; l'analyse de l'expression de la TRX z sur ces mêmes échantillons a été réalisée lors de ma troisième année de thèse afin de compléter cette étude.

Les transcrits correspondant aux dix thiorédoxines plastidiales sont détectés dans tous les organes testés de la plante, le niveau d'expression étant variable selon l'isoforme de thiorédoxine considérée (Figure 56 A).

Les gènes codant pour les TRX de type m (à l'exception de la TRX m3) et la TRX x sont exprimés de façon plus abondante que les autres thiorédoxines, leur expression étant la plus importante dans les jeunes plantules et la feuille. Les gènes codant pour les TRX f1, f2 et y2, bien qu'ayant un niveau d'expression plus faible, présentent le même profil d'expression.

Les TRX m3 et y1 présentent des profils d'expression bien distincts de ce qui est observé pour les autres thiorédoxines plastidiales. En effet, ces deux thiorédoxines sont principalement exprimées dans les organes non-photosynthétiques (siliques matures,

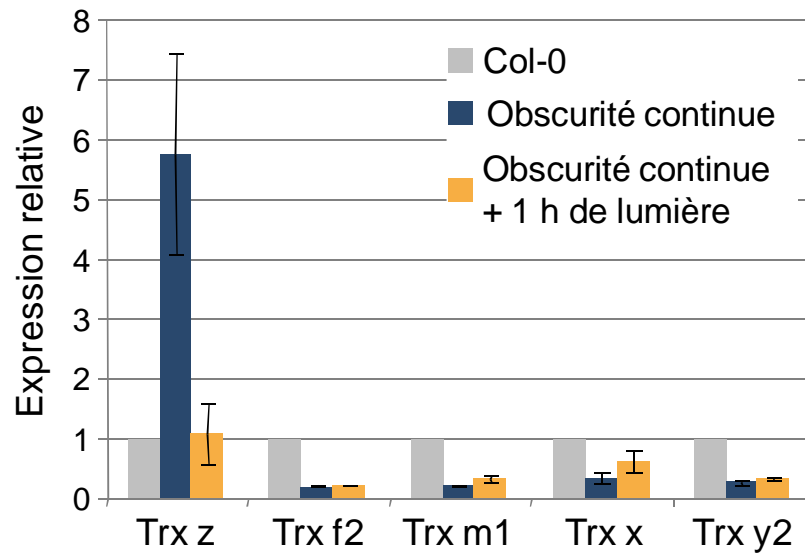


Figure 57 : Expression des thiorédoxines plastidiales selon les conditions d'éclairement.

L'expression des cinq types de thiorédoxines plastidiales a été analysée par PCR quantitative chez des plantules de 10 jours cultivées en conditions normales (photopériode jours courts, Col-0), chez des plantules cultivées pendant 10 jours à l'obscurité (Obscurité continue) et chez des plantules de 10 jours cultivées à l'obscurité puis exposées pendant une heure à la lumière (Obscurité continue + 1 h de lumière).

racines et graine). Plus particulièrement, la TRX y1 est la thiorédoxine plastidiale dont le niveau de transcrits dans les graines est le plus important.

L'analyse du niveau d'expression de la TRX z indique clairement que, parmi toutes les thiorédoxines plastidiales, le niveau d'expression de la TRX z est le plus faible (Figure 56 A). Par ailleurs, son expression est la plus forte principalement dans les organes photosynthétiques tels que les feuilles, les fleurs et les jeunes siliques (Figure 56 B).

2) Analyse de l'expression des thiorédoxines plastidiales en fonction des conditions d'éclairement

Puisque la TRX z présente un système de réduction original et peu de données d'expression de la TRX z étant connues à ce jour, nous avons entrepris d'analyser l'expression de la TRX z parmi celles des thiorédoxines plastidiales selon les conditions d'éclairement.

Pour cela, en collaboration avec Catherine Bergougnioux et Sophie Blanchet (IBP, Orsay), une analyse préliminaire, qu'il sera nécessaire de confirmer, du niveau de transcrits de la TRX z ainsi que des TRX f2, m1, x et y2, thiorédoxines dont l'expression est la plus forte dans les organes photosynthétiques ainsi qu'au stade jeune plantule (Figure 56 A), a été réalisée.

Dans un premier temps, l'analyse du niveau de transcrit dans des plantules de 10 jours cultivées en alternance jour/nuit (photopériode jours courts) a été effectuée (Figure 57, Col-0). Ce niveau de transcrits a été considéré comme étant le niveau basal d'expression des thiorédoxines et pris comme niveau d'expression de référence. Par comparaison, le niveau d'expression des TRX de types f, m, x et y dans des plantules étiolées de 10 jours, cultivées en obscurité continue (Figure 57, Obscurité continue) est beaucoup plus faible. Par contre, dans ces mêmes conditions, l'expression de la TRX z est fortement induite : son niveau de transcrits est cinq fois plus élevé.

Par ailleurs, le niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales a également été mesuré dans des plantules étiolées de 10 jours cultivées en obscurité continues puis exposées pendant une heure à la lumière (Figure 57, Obscurité continue + 1 h de lumière), permettant ainsi d'étudier l'effet de la lumière sur le niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales. Il apparaît que pour les TRX de types f, m, x et y, le traitement d'une heure de lumière n'a pas

d'effet marqué sur l'expression des gènes de ces thiorédoxines. Une nouvelle fois, la TRX z se distingue des autres thiorédoxines plastidiales : après le traitement d'une heure de lumière, le niveau de transcrits de TRX z est fortement diminué par rapport à celui observé chez des plantules étiolées n'ayant pas été exposées à la lumière (Obscurité continue). En effet, la transcription du gène codant la TRX z d'une plantule cultivée en obscurité continue est réprimée à la lumière ; après une heure d'exposition des plantules étiolées à la lumière, le niveau de transcrits atteint est le niveau basal d'expression de la TRX z en conditions normales de culture (alternance jour/nuit).

Ces résultats préliminaires indiquent donc que l'expression de la TRX z est fortement induite chez des plantules étiolées dont les plastes sont encore à l'état de proplastides. La TRX z est pourtant une protéine dont la localisation aux chloroplastes a été démontrée expérimentalement. L'induction de l'expression de la TRX z chez des plantules cultivées en obscurité continue suggère que la TRX z pourrait être impliquée dans la régulation de processus métaboliques particuliers qui ne se déroulent que chez des plantules étiolées. Par ailleurs, du fait de l'absence de chloroplastes différenciés chez les plantules étiolées, la question de la localisation subcellulaire de la TRX z se pose : la TRX z est-elle présente dans les proplastides, adressée à un autre compartiment ou séquestrée dans le cytosol ?

Les données préliminaires d'expression des différents types de thiorédoxines plastidiales selon les conditions d'éclairement indiquent que seule l'expression de la TRX z est induite chez des plantes cultivées en obscurité continue, cette expression étant fortement réprimée après un traitement d'une heure de lumière. Par ailleurs, la TRX z est la seule thiorédoxine plastidiale qui n'est pas réduite à la lumière par le système FTR (Bohrer et al., 2012). A partir de ces observations, l'analyse de l'expression de la TRX z au cours du cycle circadien a été entreprise afin de déterminer, dans un premier temps, si la TRX z est exprimée principalement la nuit, et, dans un deuxième temps, de déterminer si l'expression de la TRX z suit un rythme circadien.

3) Analyse de l'expression de la TRX z au cours du cycle circadien

Les données préliminaires d'expression des cinq types de thiorédoxines plastidiales, présentées en Figure 57, montrent que la TRX z est fortement exprimée en condition d'obscurité prolongée, contrairement aux autres types de thiorédoxines plastidiales dont l'expression est réprimée à l'obscurité. Cela suggère que l'expression de la pourrait principalement être importante la nuit.

D'autre part, une étude récente a mis en évidence que l'expression des TRX f et m1 de pois est dépendante du rythme circadien sous le contrôle du facteur CCA1 (Circadian Cycle Activator 1). En effet, lorsque les plantes sont cultivées en condition d'alternance jour/nuit classique, l'expression des TRX f et m1 est induite 3 heures avant la reprise de la lumière (Barajas-López et al., 2011). De plus, lorsque les plantes sont soumises à une phase dite d'obscurité relative, à savoir une phase de lumière qui remplace la phase d'obscurité attendue, l'expression des TRX f et m1 oscille de la même manière qu'en phase d'obscurité.

L'expression de la TRX z, ainsi que celle des neuf autres thiorédoxines plastidiales, a donc tout d'abord été suivie lors de phases de lumière et d'obscurité alternées (jour/nuit), permettant ainsi d'étudier la rythmicité de l'expression des thiorédoxines. Par la suite, l'expression des dix thiorédoxines plastidiales a été suivie lors de phases d'obscurité relative (lumière continue) ou de lumière relative (obscurité continue) dans le but de déterminer si leur expression suit le rythme circadien. En effet, si le profil d'expression de la (des) thiorédoxine(s) observé lors des phases d'obscurité et de lumière relatives est identique à celui observé lors de la phase d'alternance jour/nuit, alors l'expression de la (des) thiorédoxine(s) suit un rythme circadien. Cependant, si le niveau d'expression de la (des) thiorédoxine(s) ne varie que lors d'une des deux phases (lumière ou obscurité relative), sans varier au cours de l'autre phase, alors l'expression de la (des) thiorédoxine(s) est induite, soit à la lumière soit à l'obscurité, et ne suit pas un rythme circadien.

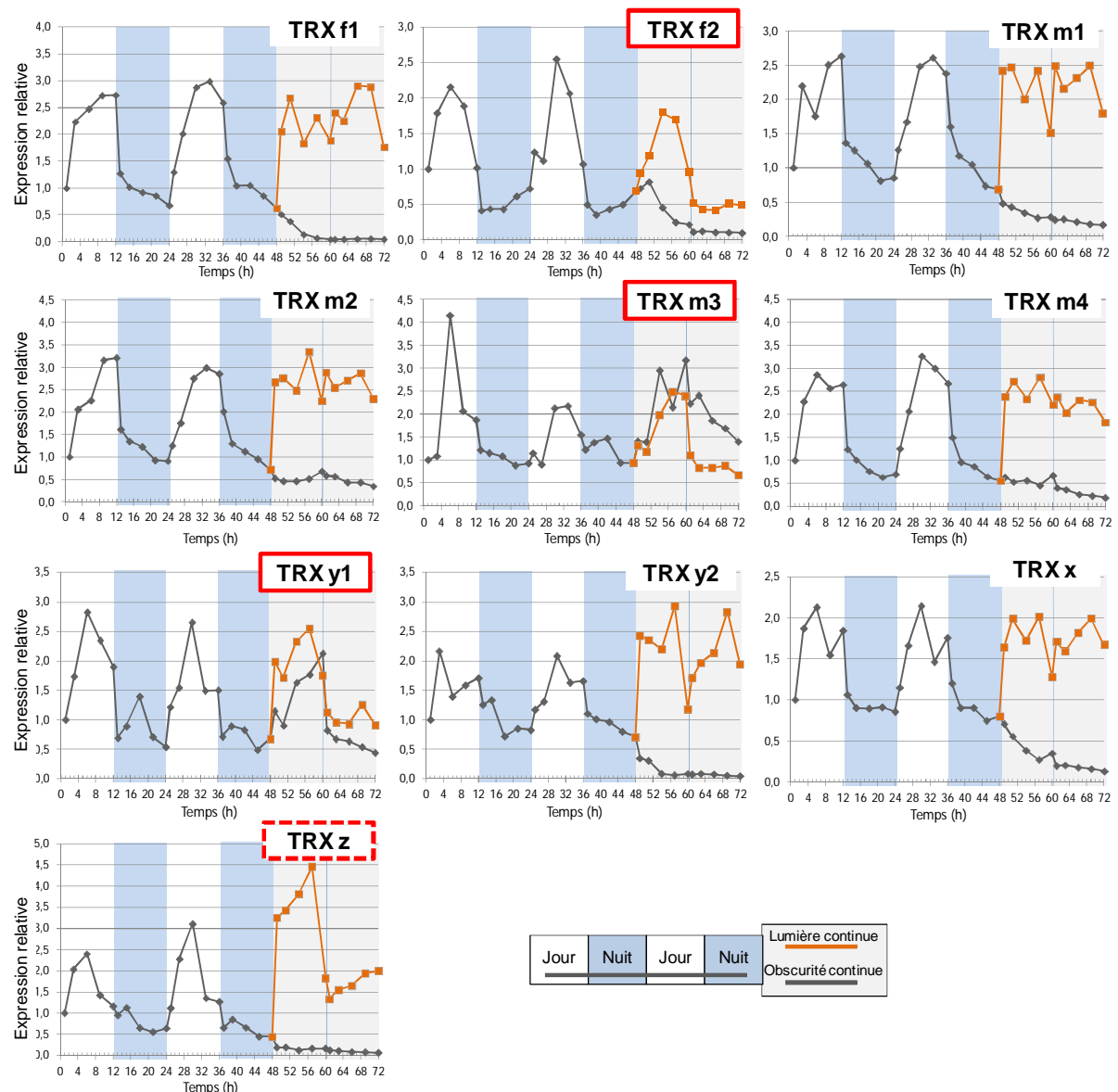


Figure 58 : Expression des thiorédoxines plastidiales au cours du cycle circadien.

Le niveau de transcrits des dix thiorédoxines plastidiales a été analysé sur trois jours successifs par PCR quantitative. Lors des deux premiers jours, les plantes sont soumises à une alternance jour/nuite (photopériode 12 heures/12 heures ; fonds blanc/bleu). Lors du troisième jour, les plantes sont soumises à 24 heures de lumière continue ou d'obscurité continue (tracés orange et gris sur fond gris respectivement). Le niveau d'expression de chaque thiorédoxine au cours de ces trois jours est normalisé par rapport au niveau d'expression détecté au temps 0 (début de la première phase de lumière).

Comme le montre la Figure 58, l'analyse du niveau de transcrits des TRX de type f, m, x, y et z indique que les transcrits de ces thiorédoxines sont induits à la lumière, le maximum d'expression étant atteint en milieu de photopériode, pour ensuite diminuer progressivement et atteindre un minimum lors de la phase d'obscurité. Après deux jours d'alternance jour/nuit, lorsque les plantes sont soumises à une période de 24 h d'obscurité ou de lumière continues, l'oscillation du niveau de transcrits et le profil d'expression observés lors de l'alternance jour/nuit se maintient uniquement pour les TRX f2, m3 et y1. L'expression de ces trois thiorédoxines plastidiales suit donc un rythme circadien (Figure 58). A l'opposé, l'expression des TRX f1, m1, m2, m4 et y2 sont certes induites à la lumière et réprimées à l'obscurité mais ne suit pas un rythme circadien puisque cette expression biphasique n'est pas conservée en lumière subjective (Figure 58).

L'expression de la TRX z, induite à la lumière et réprimée à l'obscurité, présente une particularité par rapport à celle des autres thiorédoxines plastidiales. En effet, le profil d'expression de la TRX z au cours des 24 h de la phase de lumière continue est semblable à celui observé au cours des phases d'alternance jour/nuit. Il semblerait donc que les transcrits de la TRX z suivent un rythme circadien. Cependant, lorsqu'après les deux jours d'alternance jour/nuit les plantes sont placées en obscurité continue pendant 24 heures (lumière relative), les transcrits de TRX z sont réprimés et ne varient pas au cours de cette dernière phase.

L'analyse du niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales au cours du cycle circadien montre que l'expression de la TRX z est induite à la lumière et non pas à l'obscurité comme supposé initialement (Figure 57). Par ailleurs, l'expression de la TRX z ne suit pas un rythme circadien *sensu stricto*. En effet, chez les plantes recevant un signal lumineux continu de 24 heures, l'expression de la TRX z suit un rythme circadien semblable à celui observé lors des phases d'alternance jour/nuit. Cependant, lors de la phase d'obscurité continue, la transcription du gène codant la TRX z ne se fait pas. L'expression de la TRX z, lorsqu'elle est au préalable induite à la lumière, suit donc un rythme circadien.

Des données récentes indiquent que la transcription de gènes n'est pas le seul processus qui contrôle le rythme circadien. Il a été récemment montré que des modifications post-traductionnelles contribuent au maintien du rythme circadien (Hastings et al., 2008; O'Neill

et al., 2011). Dans le cas de la TRX z, on peut donc penser que la transcription du gène est induite à la lumière mais que la rythmicité de la transcription du gène, observée en phase de lumière continue, est due à une modification post-traductionnelle contrôlée par une protéine dont l'expression suit le rythme circadien. De ce fait, en phase d'obscurité continue, le gène codant la TRX z n'étant pas transcrit, aucune rythmicité n'est observée.

B. Rôle de la TRX z dans la réponse immune innée (approche par génétique inverse)

1) Géotypage des mutants d'insertion *trx z*

Au cours de ma première année de thèse, des données relatives à la caractérisation des mutants d'insertion *trx z* ont été publiées (Arsova et al., 2010; Meng et al., 2010). Dans ces deux études, les auteurs précisent que le mutant homozygote *trx z* présente un phénotype très marqué : en conditions normales de culture (intensité lumineuse $120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$), le mutant est chlorotique et sa croissance sur milieu supplémenté en saccharose reste limitée. Une analyse plus approfondie révèle que la formation des chloroplastes est compromise chez ce mutant, rendant la photosynthèse et donc le développement de la plante très affectés. Ce phénotype peut être corrélé au rôle récemment identifié de la TRX z qui s'est avérée être une des sous-unités de l'ARN polymérase plastidiale (PEP), complexe multi-protéique impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du chloroplaste (Schröter et al., 2010). Sa mutation entrainerait ainsi un défaut d'assemblage de cette ARN polymérase plastidiale, ce qui aurait pour conséquences une mauvaise structuration des chloroplastes et de la machinerie photosynthétique.

Préalablement à l'analyse des trois lignées d'insertion dont nous disposons au laboratoire, il a été nécessaire de déterminer les conditions de culture adéquates et idéales au bon développement des individus homozygotes. Ces conditions devaient être suffisantes pour amorcer la photosynthèse, permettant ainsi aux plantes de devenir autotrophes, sans pour autant entraîner une suroxydation du milieu, qui pourrait être délétère pour les individus. Le développement des plantules s'est révélé grandement favorisé dans des conditions d'intensité lumineuse faible ($50\text{-}70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$) et sur milieu supplémenté en saccharose.

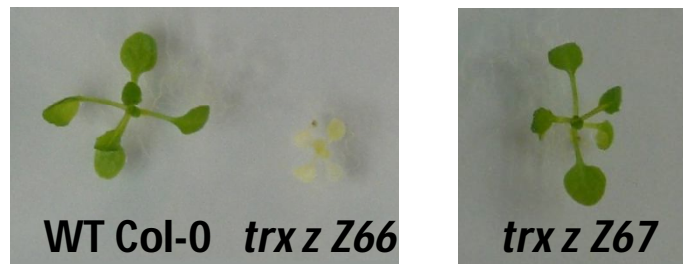


Figure 59 : Mutants d'insertion ADN-T pour le gène *trx z*.

Phénotypes des mutants homozygotes issus de la lignée Z66 (*trx z Z66*) et de la lignée Z67 (*trx z Z67*) cultivés sur milieu gélosé supplémenté en saccharose. Un individu sauvage (WT Col-0) est également présenté.

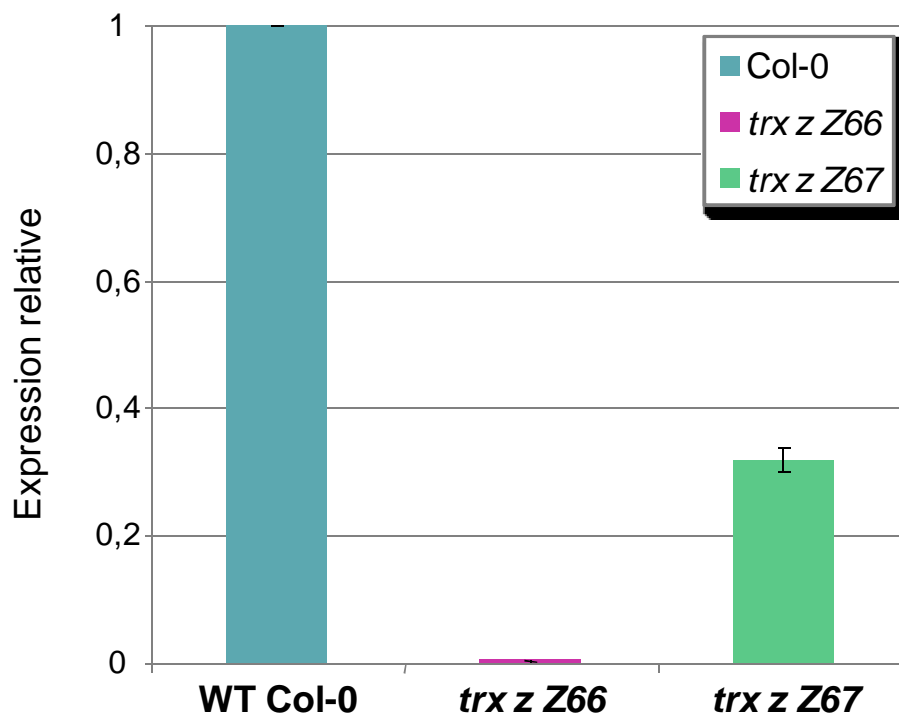


Figure 60 : Analyse du niveau de transcrits des individus homozygotes (*trx z*/*trx z*) des lignées *trx z Z66* et *trx z Z67*.

Le niveau de transcrits des individus homozygotes des lignées Z66 (*trx z Z66*) et Z67 (*trx z Z67*) pour le gène *trx z* a été analysé par PCR quantitative et comparé au niveau de transcrits mesuré chez le sauvage (WT Col-0).

Le génotypage de la génération T1 de plantes a tout d'abord permis de mettre en évidence que la lignée N658120 présente plusieurs insertions de l'ADN-T. De ce fait, notre travail s'est principalement concentré sur les lignées mutantes N661968 et N675377, que je nommerais pour la suite Z66 et Z67 respectivement. Ces deux lignées ne présentent qu'une seule insertion de la mutation.

Le génotypage de cette première génération a révélé que tous les individus de la lignée Z67 sont homozygotes (Figure 59 ; *trx z Z67*) tandis que ceux de la lignée Z66 sont hétérozygotes, le développement des individus issus de ces deux lignées étant identique à celui des individus sauvages (Figure 59 ; WT Col-0).

Lors de l'analyse de la deuxième génération d'individus de ces deux lignées, certains individus issus de la lignée Z66 présentaient un développement altéré malgré les conditions favorables de croissance (Figure 59 ; *trx z Z66*) : ces individus sont albinos, ce qui entraîne un arrêt de la croissance à un stade précoce de développement. Le génotypage de ces individus albinos a révélé que ces derniers sont homozygotes pour la mutation, ce qui est en adéquation avec ce qui avait été publié (Arsova et al., 2010; Meng et al., 2010).

Par la suite, le niveau de transcrits chez les individus homozygotes des lignées Z66 et Z67 a été analysé par PCR quantitative (Figure 60). Sans surprise, les individus homozygotes albinos de la lignée Z66 sont totalement dépourvus de transcrits de *TRX z* ; ce sont bien des individus « knock out » (KO). En revanche, les individus homozygotes de la lignée Z67, dont le développement n'est pas altéré, conservent 30% de transcrits de *TRX z* ; ce sont des individus homozygotes « knock down » (KD).

Chez les individus homozygotes KO, dont le développement ne dépasse pas le stade plantule, la mutation est létale. De ce fait, afin de réaliser la caractérisation fonctionnelle de la *TRX z* par génétique inverse, seuls les mutants homozygotes KD de la lignée Z67 ont pu être utilisés.

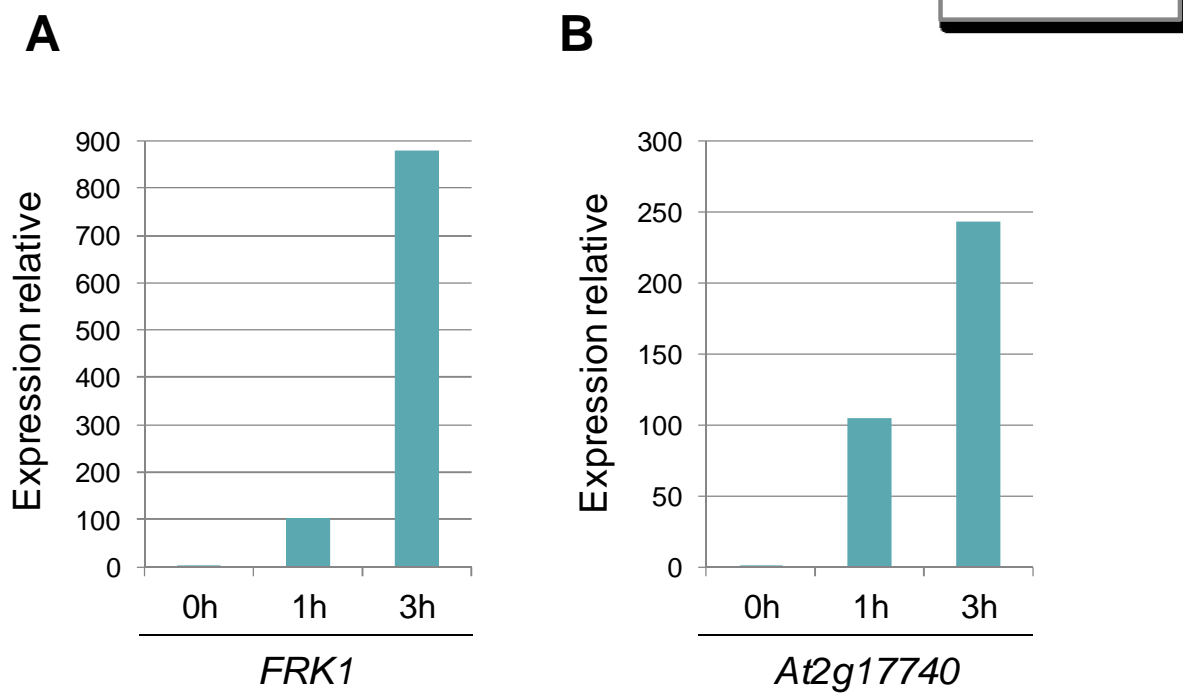


Figure 61 : Analyse de l'expression des gènes *FRK1* et *At2g17740*, gènes marqueurs de la voie de la PTI, chez les plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana* (WT Col-0) en réponse à la flg 22.

2) Étude du rôle de la TRX z au cours de la réponse immune innée

a) Validation de la procédure expérimentale

En 2005, une étude réalisée dans le but d'identifier des substrats des protéines kinases MAPK 3 et MAPK 6 (Mitogen-activated Protein Kinases) (Feilner et al., 2005) a permis d'identifier les TRX z et m1 comme substrats potentiels pour ces deux MAP kinases.

Par ailleurs, il est connu que les MAP kinases 3 et 6 sont activées en réponse à la flagelline 22 (flg 22), protéine structurale qui forme la portion principale des filaments flagellaires des bactéries. La flg 22 est un éliciteur de la catégorie des « Pathogenesis-Associated Molecular Patterns » (PAMP), qui, lorsqu'il est reconnu par le récepteur trans-membranaire FLS2 d'*Arabidopsis* (FLAGELLIN SENSITIVE 2), déclenche rapidement les réponses de défense immune innée dépendantes des MAP kinases chez la plante hôte (« PAMP-triggered immunity, PTI») (Asai et al., 2002). L'activation par phosphorylation de ces kinases, seulement 10 minutes après la perception de la flg 22, conduit, entre autre, à l'activation de la transcription des gènes marqueurs *FLG 22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1* (FRK1) et *At2g17740*, dont les profils d'expression en réponse à la flg 22 sont semblables (Asai et al., 2002; He et al., 2006). De ce fait, l'activation des MAP kinases 3 et 6 permet de réguler positivement les réponses de défense en réponse à la flg 22.

Dans un premier temps, afin de valider la procédure expérimentale choisie pour réaliser l'étude du rôle de la TRX z dans la réponse de défense immune innée en réponse à la flg 22, l'expression des gènes marqueurs de la voie PTI, *FRK1* et *At2g17740*, en réponse à la flg 22 a été étudiée chez des plantes sauvages (WT Col-0) d'*Arabidopsis thaliana*. Après infiltration de la flg 22 (100 nM), l'expression du gène *FRK1* (Figure 61 A) et du gène *At2g17740* (Figure 61 B) est fortement induite : comparée à l'expression de ces gènes avant inoculation (temps « 0h »), l'expression relative des gènes *FRK1* et *At2g17740* est 100 fois plus importante dès une heure de traitement (temps « 1h »). Après 3 heures de traitement (temps « 3h »), l'induction de leur expression est encore augmentée : l'expression du gène *FRK1* est 9 fois plus importante qu'après une heure de traitement et l'expression du gène *At2g17740* est 2,5 fois plus importante. Le profil d'induction de l'expression de ces deux gènes en réponse à la flg 22 obtenu ici est par ailleurs similaire aux données publiées récemment (Albrecht et al.,

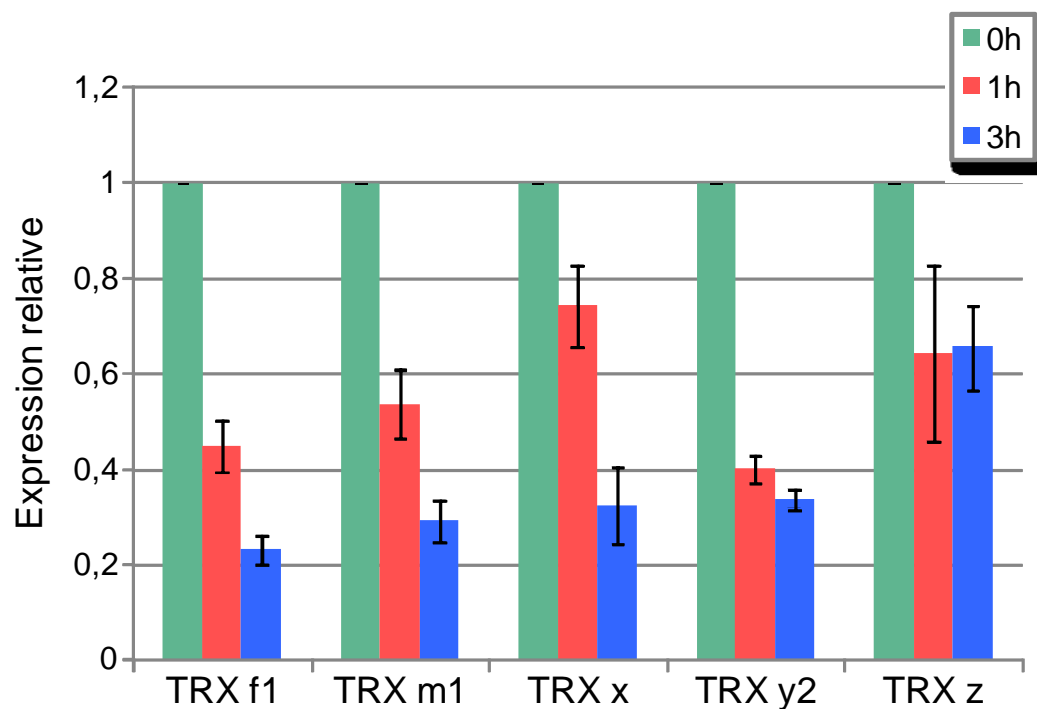


Figure 62 : Expression des thiorédoxines plastidiales en réponse à la flg 22 chez *Arabidopsis thaliana* (Col-0).

Les plantes d'*Arabidopsis* ont été traitées à la flg 22 par infiltration. Le niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales a ensuite été analysé par PCR quantitative avant infiltration (0h) et après 1 heure ou 3 heures de traitement (1h, 3h) à la flg 22.

2012). Cela nous a donc permis de valider l'approche expérimentale choisie (concentration en flg 22, méthode d'infiltration et temps de réponse étudiés). Ainsi, lors de l'étude de l'expression des gènes *FRK1* et *At2g17740* chez le mutant *trx z*, si une différence de réponse est observée, cela sera lié à la mutation sur le gène codant la TRX z.

b) Etude de l'expression de l'ensemble des thiorédoxines plastidiales en réponse à la flg 22

Une fois l'approche expérimentale validée, le niveau de transcrits des thiorédoxines plastidiales (TRX f1, m1, x, y2 et z) chez des plantes sauvages (WT Col-0) traitées à la flg 22 a été analysé par PCR quantitative (Figure 62).

Tout d'abord, par comparaison au niveau basal d'expression (temps « 0h »), après une heure de traitement à la flg 22 (temps « 1h ») l'expression des TRX f1, m1, y2, x et z est réprimée ; néanmoins, l'expression des TRX x et z semble moins affectée par le traitement que l'expression des TRX f1, m1 et y2. Lorsque le niveau de transcrits des thiorédoxines est analysé après trois heures de traitement à la flg 22 (temps « 3h »), on remarque que celui des TRX f1, m1, y2 et x est encore moindre qu'après une heure de traitement. Cependant, l'expression de la TRX z ne varie pas et reste la même que celle observée après une heure de traitement.

Ainsi, après trois heures de traitement à la flg 22, temps auquel l'expression des gènes marqueur de la voie PTI, *FRK1* et *At2g17740*, est la plus induite (Figure 61 A et B), seule l'expression de la TRX z varie peu et reste importante. Par ailleurs, bien que les TRX z et m1 aient été identifiées comme des substrats potentiels des MAP kinases 3 et 6 (Feilner et al., 2005), l'expression de la TRX m1 en réponse à la flg 22 est réprimée, particulièrement après 3 heures de traitement, alors que celle de la TRX z l'est beaucoup moins.

Cela suggère donc que, parmi les différentes thiorédoxines plastidiales testées, la TRX z est la thiorédoxine qui présente la meilleure probabilité d'être impliquée, directement ou non, dans la mise en place des réponses de défense immune innée après traitement à la flg 22. L'étude du rôle de la TRX z au cours d'une telle réponse a ainsi été menée chez le mutant *trx z* décrit précédemment (VI. B. 1)) par comparaison à ce qui est observée chez le sauvage (WT Col-0).

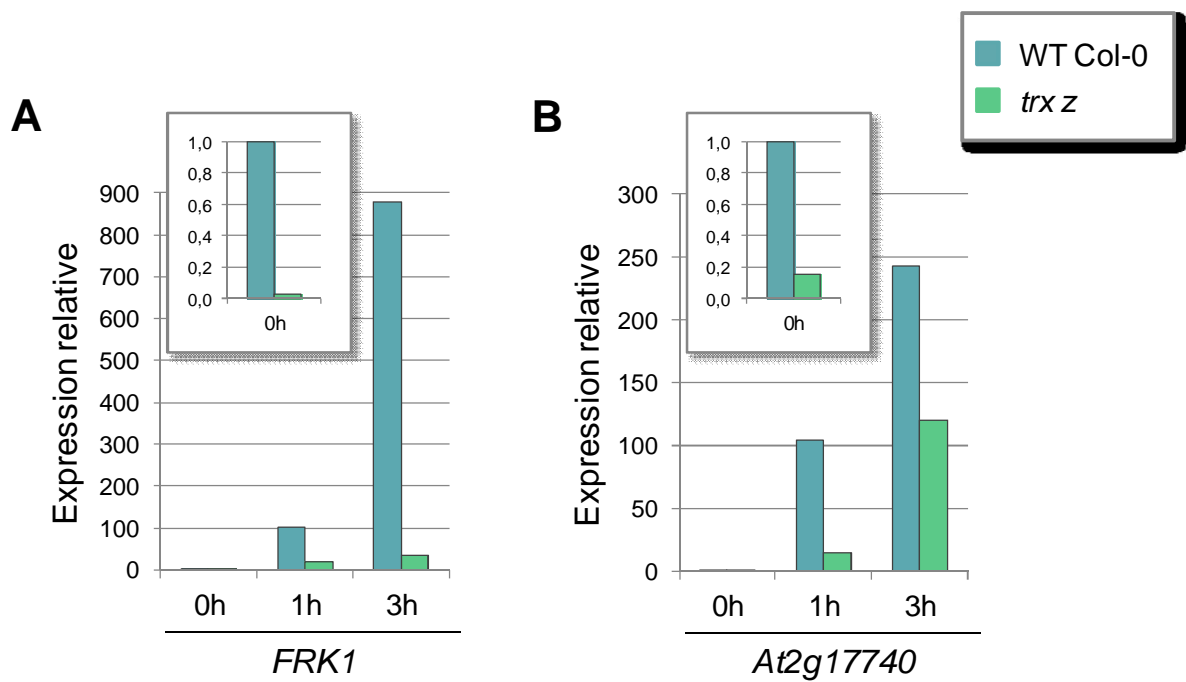


Figure 63 : Analyse de l'expression des gènes FRK1 et At2g17740, gènes marqueurs de la voie de la PTI, chez le sauvage (WT Col-0) et le mutant *trx z* en réponse à la flg 22.

Le niveau de transcrits des gènes marqueurs de la voie de la PTI FRK1 et At2g17740 a été analysé par PCR quantitative chez des plantes sauvages (WT Col-0) et des plantes mutées pour le gène TRX z (*trx z*, mutant homozygote « knock down »).

c) Étude du rôle de la TRX z dans la réponse immune innée

i. Expression des gènes marqueurs de la voie PTI

Dans un premier temps, l'étude du rôle de la TRX z dans les réponses de défense immune innée après traitement à la flg 22 a débuté par une analyse préliminaire du niveau de transcrits des deux gènes marqueurs de la voie de la PTI, *FRK1* et *At2g17740*, chez le mutant « knock down » *trx z*, par comparaison à ce qui est observé chez le sauvage (WT Col-0) (Figure 63).

L'analyse du niveau de transcrits de ces deux mêmes gènes marqueurs chez le mutant *trx z* indique tout d'abord que le niveau basal d'expression de ces gènes avant inoculation est considérablement diminué chez le mutant (Figure 63 A et B). En effet, le niveau d'expression du gène *FRK1* est 50 fois plus faible chez le mutant *trx z* que chez le sauvage (Figure 63 A) tandis que le niveau d'expression du gène *At2g17740* est 7 fois plus faible chez le mutant *trx z* que chez le sauvage (Figure 63 B). Cependant, après une heure de traitement à la flg 22 (temps « 1h »), l'expression des gènes *FRK1* et *At2g17740* est induite, l'induction étant plus importante après trois heures de traitement (temps « 3h »). L'induction de l'expression de ces gènes peut d'ailleurs être expliquée par la présence résiduelle de 30% de transcrits de *TRX z* chez le mutant. Néanmoins, bien que le profil d'expression de ces deux gènes marqueurs soit semblable à ce qui est observé chez le sauvage (WT Col-0), leur niveau d'expression reste considérablement plus faible chez le mutant *trx z*.

Ainsi, l'expression des gènes marqueurs *FRK1* et *At2g17740* chez le mutant *trx z* avant inoculation (temps « 0h ») est fortement réprimée par comparaison avec le niveau basal d'expression mesuré chez le sauvage (WT Col-0). Cela indique donc que la présence de la TRX z est indispensable à la bonne expression de ces gènes, suggérant ainsi que la TRX z joue un rôle, direct ou indirect, sur leur transcription. Par ailleurs, bien que l'expression de ces gènes soit induite chez le mutant *trx z*, leur niveau d'expression, en particulier celui du gène *FRK1* après trois heures de traitement à la flg 22, n'atteint pas le niveau de transcrits détecté chez le sauvage.

La transcription de ces gènes est donc compromise en absence de TRX z, suggérant que la voie PTI n'est vraisemblablement pas mise en place.

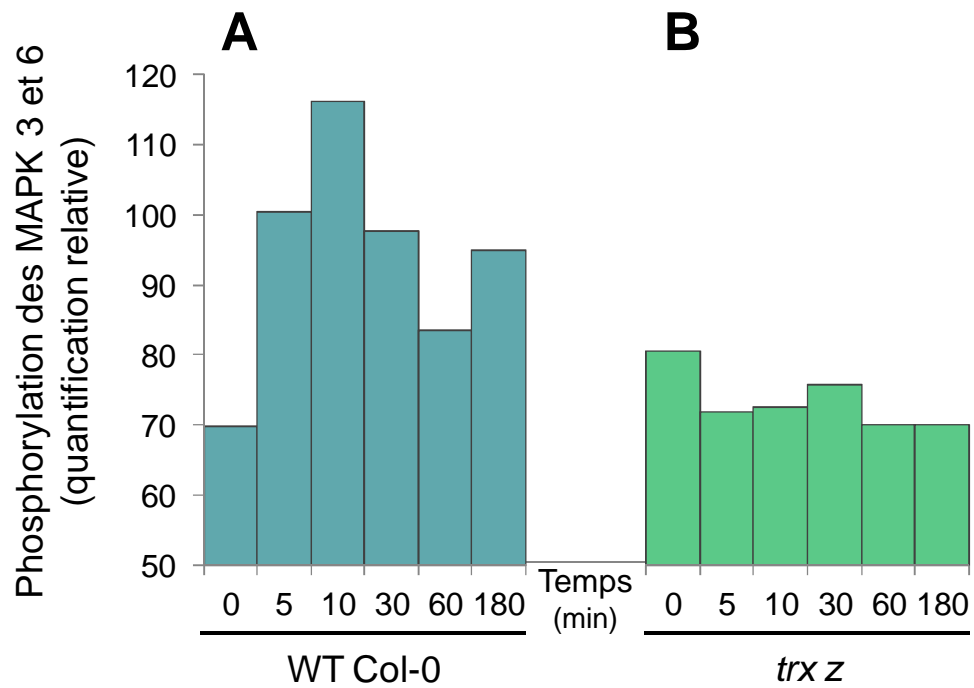


Figure 64 : Quantification relative de l'état d'activation des MAP kinases 3 et 6 chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à la flg 22.

L'état d'activation des MAPK 3 et 6 en réponse à la flg 22 a été analysé par Western blot chez le sauvage (WT Col-0) et le mutant *trx z*.

Si l'expression des marqueurs de la voie PTI est autant affectée en absence de TRX z, qu'en est-il des acteurs précoces, voire déclencheurs, de cette voie ?

ii. Analyse de l'activation des MAP kinases 3 et 6

L'état d'activation des MAP kinases 3 et 6 chez le sauvage (WT Col-0) et le mutant *trx z* a été analysé après induction à la flg 22. L'activation des MAPK, caractérisée par leur phosphorylation, a été détectée par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés spécialement contre le site phosphorylé des MAPK puis quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Chez le sauvage (WT Col-0) (Figure 64 A), les MAP kinases 3 et 6 sont activées rapidement en réponse à la flg 22. La phosphorylation, et donc l'activation, de ces kinases est visible dès 5 minutes après le traitement à la flg 22 et atteint son maximum après 10 minutes seulement, pour ensuite diminuer (Figure 64 A). Cette cinétique d'activation des MAP kinases 3 et 6 en réponse à la flg 22 est en parfaite adéquation avec celle déjà publiée (Albrecht et al., 2012). En effet, les MAPK 3 et 6 sont connues pour intervenir de façon précoce dans la cascade de réponses de défense immune innée chez la plante après perception de la flg 22.

Chez le mutant *trx z* (Figure 64 B), aucune phosphorylation significative des MAP kinases 3 et 6 n'est observée, indiquant que celles-ci ne sont pas activées en absence de TRX z en réponse à la flg 22. Il semble donc que la TRX z soit impliquée ou requise lors de l'étape d'activation de ces acteurs précoces de la mise en place de la voie PTI.

Bien que préliminaires, l'ensemble de ces résultats indique tout d'abord que la TRX z se distingue des autres thiorédoxines plastidiales, puisqu'en réponse à la flg 22, son expression est certes réprimée, mais de façon moins importante que ce qui est observé pour les TRX de type f, m, x et y. Par ailleurs, en réponse à la flg 22, aucune activation par phosphorylation des MAPK 3 et 6 ne semble se produire. Enfin, la mutation du gène *TRX z* entraîne une répression considérable de l'expression des gènes *FRK1* et *At2g17740*, gènes dont l'expression est induite lors du déclenchement de la PTI en réponse à la flg 22.

Ces données préliminaires suggèrent ainsi que la TRX z joue un rôle lors du processus de modification post-traductionnelle par phosphorylation des MAP kinases : la TRX z pourrait intervenir directement au niveau de ces MAP kinases ou intervenir en amont des MAP

kinases afin de réguler leur activation, voire le déclenchement de la voie de la réponse immune innée.

Discussion & Perspectives

Le but de ce travail était de caractériser biochimiquement et fonctionnellement la dixième thiorédoxine plastidiale d'*Arabidopsis thaliana*, la TRX z, dont la localisation subcellulaire a été démontrée en 2010, plusieurs mois après le début de ma thèse (Arsova et al., 2010; Meng et al., 2010). Afin de réaliser la caractérisation biochimique de la TRX z, il était tout d'abord nécessaire de produire et purifier la protéine recombinante. Compte tenu de la longue expérience de mon équipe d'accueil en matière de production et purification de protéines recombinantes matures, non étiquetées (Valérie Collin a, au cours de sa thèse, produit et purifié les neuf autres thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis* sans problème (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004)), la tâche semblait triviale. Or, l'utilisation du protocole standard mis au point dans le laboratoire a abouti à des résultats tout à fait inattendus. En effet, dès l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium, la TRX z s'est comportée de façon inhabituelle pour une thiorédoxine : elle précipite à une faible concentration en sel, avec les protéines de masse moléculaire élevée, et non pas à forte concentration (ca. 80% de saturation) comme les autres thiorédoxines. Cela suggérait que la TRX z interagit avec d'autres protéines pour former un complexe protéique de masse moléculaire élevée. Cette caractéristique a, cependant, l'avantage de permettre de séparer efficacement la TRX z recombinante de la TRX endogène d'*E. coli*.

La capacité de la TRX z à interagir avec d'autres protéines a par ailleurs été confirmée lors de sa purification par chromatographie d'exclusion (G-50), au cours de laquelle il s'est avéré que le complexe protéique formé pouvait également se lier fortement aux acides nucléiques. La purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (DEAE) qui a suivi a permis l'élimination des acides nucléiques, l'élution de la TRX z se faisant à une concentration en NaCl de 0,3-0,4 M. Une étape de chromatographie sur colonne échangeuse d'anions de type monoQ a été nécessaire, l'échantillon ayant été préalablement réduit au DTT pour améliorer la résolution. Cette étape a permis d'obtenir une préparation homogène et pure de TRX z recombinante, qui s'est éluée, cette fois-ci, à une concentration en NaCl de 700 mM tandis que, sur cette même colonne, la TRX d'*E. coli* est éluée à une concentration en NaCl de 160 mM. La récente modélisation de la structure 3D de la TRX z indique qu'elle présente une charge globale de surface très acide, donc très négative (König et al., 2012), ce qui justifie qu'une concentration en NaCl élevée soit nécessaire à son élution. La différence de comportement de la TRX z lors des deux étapes de chromatographie sur colonnes

échangeuses d'anions est due très probablement au fait que, sur la colonne de type DEAE, la TRX z est sans doute sous forme de dimère et/ou est complexée avec d'autres protéines, alors qu'elle est monomérique sur la colonne de type monoQ, du fait du traitement préalable au DTT. Ses charges négatives sont sans doute plus accessibles dans ces conditions, renforçant sa rétention sur la colonne de type monoQ. Cette hypothèse mériterait confirmation, en comparant le comportement chromatographique de la TRX z oxydée ou réduite sur colonne mono-Q.

Le protocole de purification de la TRX z reflète donc ses propriétés physico chimiques, différentes de celles des autres thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis*. La TRX z a ainsi pu être produite et purifiée sous sa forme non étiquetée. Toutefois, le faible rendement de purification ne permettait pas d'envisager sa caractérisation biochimique. Une stratégie d'étiquetage de la protéine recombinante a donc été mise en place.

La stratégie de production et de purification de la TRX z recombinante fusionnée à une étiquette *Strep*-tag a largement facilité son obtention en quantité suffisante pour permettre sa caractérisation biochimique. La protéine étiquetée s'élue de la colonne Streptavidine sans former de complexe avec d'autres protéines. Par contre, elle se présente comme un mélange de monomères et de dimères, ces deux formes étant oxydées lors de l'élution. Ce n'est qu'en présence d'une concentration en DTT élevée (100 mM) que les dimères de TRX z disparaissent totalement et que les monomères sont réduits. La TRX z se monomériser donc lors de sa réduction.

La capacité de la TRX z à interagir avec elle-même a par ailleurs été confirmée par une approche *in vivo* en système hétérologue dans la levure. C'est la seule thiorédoxine plastidiale à se comporter ainsi, si l'on excepte le cas particulier de la TRX f1 qui se dimérise par le biais d'un résidu cystéine additionnel (Michelet et al., 2005), dont la TRX z est dépourvue. La mutation des deux résidus cystéine du site actif de chaque partenaire empêche la dimérisation. Par contre, la mutation d'un seul résidu sur chaque partenaire ne l'empêche pas. Cela suggère donc que la capacité de la TRX z à interagir avec elle-même *in vitro* et *in vivo* n'est pas uniquement liée à son état redox. La TRX z pourrait soit interagir d'abord avec elle-même *via* des liaisons électrostatiques suivi de la formation d'un ou deux ponts disulfure inter-moléculaires permettant de stabiliser le dimère, soit former d'abord un ou deux ponts disulfure, l'orientation des deux protéines l'une par rapport à l'autre favorisant

alors l'interaction. La formation de pont(s) disulfure couplée à une interaction électrostatique justifierait qu'il soit si difficile de réduire la TRX z *in vitro*, 100 mM de DTT étant nécessaires là où quelques mM suffisent à réduire toutes les autres thiorédoxines.

Cette particularité de dimérisation/monomérisation de la TRX z en fonction de son état oxydé/réduit a pu être utilisé pour étudier son (ses) système(s) de réduction.

Alors que l'ensemble des thiorédoxines chloroplastiques étudiées jusqu'alors sont réduites à la lumière par le système ferrédoxine-thiorédoxine, par l'intermédiaire de la FTR, la TRX z, étonnamment, ne l'est pas. La TRX z est donc la première thiorédoxine chloroplastique qui n'est pas réduite par le système FTR dépendant de la lumière (Bohrer et al., 2012). La TRX z est pourtant exprimée principalement dans les tissus photosynthétiques. De plus, aucun système de réduction, connu (NTR ou GSH/GRX) ou proposé (NTRC), n'est capable de réduire cette thiorédoxine efficacement (Bohrer et al., 2012).

Dans le système FTR reconstitué *in vitro*, à l'obscurité, la TRX z est présente sous forme de dimères oxydés. Lors du passage à la lumière, la proportion de dimères oxydés est plus grande et augmente au cours de l'illumination. La TRX z n'est cependant jamais présente sous forme de monomères, même à l'obscurité, alors qu'elle apparaît toujours sous forme d'un mélange de monomères et de dimères dans toutes les autres préparations. Cela suggère qu'une proportion de TRX z est contenue dans la partie insoluble à l'obscurité, *i.e.* les membranes des thylacoïdes, et qu'au cours de l'illumination, la TRX z est progressivement rendue soluble. Un tel comportement a été observé auparavant pour la FNR, dont l'interaction avec les membranes des thylacoïdes est dépendante du pH (Grzyb et al., 2008) et de son interaction avec les protéines membranaires Tic62 et TROL (Benz et al., 2009; Jurić et al., 2009). Ces protéines permettent de stabiliser la FNR sans modifier son activité. A la lumière, l'alcalinisation du milieu favorise le détachement du complexe protéique FNR-Tic62/TROL des membranes des thylacoïdes. Ce mécanisme permet ainsi de réguler le flux d'électrons dépendant de la ferrédoxine dans le chloroplaste en modulant la disponibilité de la FNR (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010). Le comportement de la TRX z dans le système lumière reconstitué suggère qu'elle pourrait présenter un mécanisme similaire. La TRX z pourrait interagir soit directement avec les membranes des thylacoïdes, soit par l'intermédiaire d'une autre protéine (Figure 65). De façon surprenante, la FNR et la 2-Cys PRX, qui peut également être associée aux membranes des thylacoïdes (Baier and Dietz, 1999),

ont été identifiées avec la TRX z dans le complexe multiprotéique de l'ARN polymérase plastidiale (Schröter et al., 2010). La 2-Cys PRX a également été identifiée, par approche protéomique, comme cible putative de la TRX z et confirmée par approche biochimique. De ce fait, il est possible que la TRX z soit localisée aux membranes des thylacoïdes *via* son interaction avec la FNR et/ou la 2-Cys PRX et, qu'au cours de l'illumination, elle soit relâchée dans le stroma. Il serait intéressant d'étudier le comportement de la TRX z dans le système lumière reconstitué en suivant sont état monomères/dimères dans les fractions soluble et insoluble (protéines du stroma et thylacoïdes), à l'obscurité et après illumination, afin de valider que la TRX z est effectivement associée aux membranes des thylacoïdes. Cette approche pourra être complétée, le cas échéant, par une étude fine de la localisation subcellulaire de la TRX z dans le chloroplaste par microscopie électronique à transmission.

L'étude de l'expression de la TRX z a permis de mettre en évidence, non seulement que ses transcrits s'accumulent dans les tissus photosynthétiques, mais aussi que son expression est induite à la lumière et semble suivre un rythme circadien indépendant de la transcription, comme celui récemment décrit (O'Neill et al., 2011). La rythmicité de l'expression de la TRX z pourrait donc être liée à une modification post-traductionnelle du facteur qui régule sa transcription. Cette observation reflète à nouveau le caractère unique de la TRX z puisqu'aucune autre thiorédoxine plastidiale canonique n'a montré cette particularité. Ces données devront par ailleurs être confirmées au niveau protéique par Western blot. Toutefois, la détection d'un ARN messager indique généralement la présence de la protéine traduite correspondante. Cela suppose donc que le système de réduction de la TRX z doit également être présent à la lumière, en même temps. En parallèle de ce travail, il a été montré que la TRX z a un potentiel redox moins électronégatif que celui des autres thiorédoxines plastidiales (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004; Chibani et al., 2011). Ces autres thiorédoxines peuvent donc, théoriquement, donner leurs électrons à la TRX z et ainsi la réduire. En effet, la TRX z peut être réduite *in vitro* par les autres types de thiorédoxines plastidiales, la plus efficace étant la TRX f1 (Bohrer et al., 2012) (Figure 65). Il est intéressant de noter que la TRX f1 a été identifiée comme cible potentielle de la TRX z au cours de notre approche protéomique. Il est donc probable que la TRX f1, réduite par le système FTR à la lumière, réduise la TRX z *in vivo*. Afin de tester cette hypothèse dans ce contexte

physiologique, la réduction de la TRX z dans le système lumière reconstitué en présence de FTR et de TRX f1 va être analysée. La question qui émane de cela est pourquoi la TRX z, bien que chloroplastique, a-t-elle besoin d'une autre thiorédoxine pour être réduite et ne peut pas être directement réduite à la lumière par le système FTR ? Ceci est peut-être dû à un problème d'accessibilité de la FTR au site actif de la TRX z.

C'est la première fois que l'on a pu montrer qu'une thiorédoxine est réduite par une autre thiorédoxine. Il serait d'ailleurs intéressant de tester si d'autres thiorédoxines peuvent échanger leur pouvoir réducteur. La réduction de la TRX z par les autres thiorédoxines plastidiales suggère qu'elles interagissent et que le statut redox des thiorédoxines plastidiales est interconnecté. Leur état d'oxydoréduction pourrait ainsi refléter l'homéostasie redox dans le chloroplaste. Les thiorédoxines sont en effet considérées comme des transmetteurs des signaux de la cellule, ces signaux étant transmis aux cibles des thiorédoxines, afin de réguler leur activité. Ces cibles peuvent ensuite réguler, positivement ou négativement, certains métabolismes dans un contexte cellulaire oxydoréducteur favorable ou non. L'échange de pouvoir réducteur entre deux thiorédoxines suggère en effet une interconnexion d'autant plus vaste et complexe entre les métabolismes que régulent ces protéines.

Le système de réduction de la TRX z étant établi, nous avons recherché ses cibles. Dans un premier temps, quelques cibles classiques des thiorédoxines ont été testées *in vitro*. Le test de réduction de l'insuline est classiquement utilisé pour valider la capacité d'oxydoréductase d'une thiorédoxine (Holmgren, 1979). Étonnamment, la TRX z est incapable de réduire l'insuline. Il s'avère d'ailleurs qu'en présence de DTT et de TRX z, la réduction de l'insuline est moindre qu'en présence de DTT seul. La TRX z annule donc l'effet réducteur du DTT. La TRX z pourrait ainsi interagir avec l'insuline, empêchant l'accès du DTT au pont inter-moléculaire de l'insuline et freinant ainsi sa réduction. La réduction de cibles plastidiales classiques telles que la MDH à NADP ou la G6PDH ont été testées sans succès. La TRX z, toutefois, est capable de donner ses électrons à la 2-Cys PRX, son efficacité vis-à-vis de cette enzyme est cependant faible.

Les études biochimiques, qui ont révélé des caractéristiques originales de la TRX z, la distinguent nettement des autres thiorédoxines plastidiales. Ce travail n'a, par contre, pas permis de lui trouver une cible spécifique. Une vaste recherche des cibles de la TRX z a donc

été entreprise par approches *in vitro* (protéomique) et *in vivo* (criblage double hybride). Du fait de la facilité de la TRX z à interagir avec d'autres protéines par liaisons électrostatiques, l'approche protéomique sur colonne d'affinité a été réalisée en utilisant la TRX z native, non monocystéinique, approche déjà utilisée lors de la recherche de cibles de la TRX f1 (Balmer et al., 2004). Des extraits foliaires de fin de nuit ont par ailleurs été utilisés ici afin de viser d'autres types de processus et métabolismes que ceux déjà identifiés, rendant cette approche nouvelle. L'approche par criblage double hybride a été réalisée avec une souche de levure déficiente en thiorédoxines endogènes (Vignols et al., 2005), ce qui augmente la spécificité des cibles identifiées.

Parmi les cibles potentielles de la TRX z identifiées, de nombreuses cibles sont des protéines de liaison à l'ARN ou l'ADN parmi lesquelles les protéines CSP41a et CSP41b, dont une au moins a déjà été identifiée auparavant par Balmer et collaborateurs (2004) comme cible potentielle de la TRX f1, sont d'un grand intérêt. En effet, ces protéines sont également retrouvées dans le complexe PEP et interviennent dans les processus de transcription et de traduction des ARN plastidiaux (Bollenbach et al., 2009). Curieusement, la TRX z a été identifiée comme un élément de chromosomes plastidiaux transcriptionnellement actifs (pTAC ; Pfalz et al., 2006) dont la mutation est responsable de la répression de l'expression des gènes plastidiaux. Par ailleurs, la TRX z est également décrite comme une sous-unité de l'ARN polymérase plastidiale (complexe PEP). Plus particulièrement, la TRX z est une protéine associée au complexe PEP dont la présence est essentielle pour l'activité de la polymérase (Steiner et al., 2011). Il apparaît donc que la TRX z joue un rôle dans la transcription des gènes plastidiaux (Figure 65). L'implication de la fonction redox de la TRX z n'a cependant pas encore été établie. Chez la tomate, il a été montré que la CITRX joue le rôle d'adaptateur entre le récepteur membranaire Cf-9 et la protéine kinase ACIK1, cette interaction étant indépendante de la fonction redox de la CITRX. Une telle fonction d'adaptateur de la TRX z dans le complexe PEP est envisagée : en effet, il a été montré que la régulation de la transcription des gènes plastidiaux par le complexe PEP fait intervenir des modifications post-traductionnelles des éléments associés à l'ARN polymérase plastidiale, telles que la phosphorylation et la régulation redox (Steiner et al., 2009). L'identification de la TRX z comme élément associé à l'ARN polymérase plastidiale en fait, de ce fait, un bon candidat pour lier la régulation redox à la transcription des gènes (Schröter et al., 2010). De plus, la

TRX z a récemment été proposée comme un acteur supplémentaire de l'expression des gènes de la photosynthèse (Dietz and Pfannschmidt, 2011). Dans ce modèle, la TRX z pourrait interagir avec une cascade de signalisation dépendante de la phosphorylation comprenant une cascade de kinases qui régulent la transcription relative du gène *psaA* qui code pour l'apoprotéine P700 du photosystème I (Shimizu et al., 2010).

La TRX z est donc impliquée dans la régulation de l'expression des gènes plastidiaux, au niveau transcriptionnel et, potentiellement, au niveau traductionnel, et occupe de ce fait une place importante dans les mécanismes de mise en place et de stabilisation des chloroplastes. Il reste cependant à déterminer si cette régulation implique la fonction d'oxydoréductase de la TRX z, traduisant ainsi une modification post-traductionnelle de type redox de la cible, ou s'il s'agit d'une interaction protéine-protéine, dépendante du statut redox de la TRX z ou de l'environnement redox de la cellule, mais qui impliquerait davantage un changement de conformation de la cible résultant en une modification de son activité. La TRX z apparaît comme un important senseur de l'état redox du chloroplaste, pouvant être potentiellement oxydé par la 2-Cys PRX, senseur des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et réduit par d'autres thiorédoxines plastidiales, senseurs indirects de la lumière. Cela révèle donc le potentiel rôle majeur de la TRX z dans l'homéostasie redox du chloroplaste.

L'ensemble de ces résultats souligne le rôle unique de cette thiorédoxine dans le développement de la plante, ce qui est en accord avec les observations faites sur le mutant *trx z*. En effet, l'absence de TRX z chez les mutants homozygotes nuls est responsable d'un phénotype sévère : le développement des mutants n'est possible que sur milieu supplémenté en saccharose mais reste limité puisque les plantules, qui présentent un blanchiment des feuilles, ont un défaut de formation des thylacoïdes (Arsova et al., 2010). Parmi tous les mutants simples de thiorédoxines plastidiales, seul le mutant *trx m3 (gat1)* présente un phénotype marqué (Benitez-Alfonso et al., 2009). La mutation des autres thiorédoxines plastidiales n'entraîne pas l'apparition de phénotype visible en conditions optimales de croissance (Pulido et al., 2010; Laugier et al., 2012; Thormählen et al., 2012).

Parmi les 91 cibles putatives de la TRX z identifiées au total, seulement trois ont été identifiées par les deux approches expérimentales : la protéine de stockage « Vegetative Storage 2 » (VSP2), la petite sous-unité 3B de la RuBisCO et la TRX z elle-même. Cela souligne

bien la complémentarité de ces deux approches et la nécessité de multiplier les techniques spécifiques dans le but d'obtenir un inventaire exhaustif des cibles potentielles d'une thiorédoxine. Une recherche de cibles par une approche protéomique identique a permis d'identifier 27 nouvelles cibles de la TRX f1 (Balmer et al., 2004), dont 10 n'avaient jamais été identifiées comme cibles de thiorédoxine. Ici, près de 60 cibles de la TRX z, sur les 78 identifiées au total par protéomique, sont des nouvelles cibles de thiorédoxine, indiquant la spécificité de l'approche. Parmi les cibles connues, certaines sont désormais des cibles validées des thiorédoxines plastidiales (RuBisCO activase et GAPDH).

Peu de cibles putatives identifiées sont des enzymes impliquées dans les métabolismes carboné et azoté mais une grande majorité de ces cibles est impliquée dans des processus liés à la réponse de défense de la plante lors de stress biotiques et/ou abiotiques ou sont induites dans de telles conditions (environ 30% des cibles identifiées). Cela suggère donc un rôle particulier de la TRX z dans ces processus, tant au niveau de la détoxification des ROS (PRX-Q, 2-Cys PRX, catalase 3), produits en grande quantité lors des stress (a)biotiques, que dans les réponses de défense mises en place après attaque biotique, herbivore ou pathogène (myrosinases 1 et 2, β -galactosidase 10, 3-ketoacyl-CoA thiolases 1 et 2, chitinase-like, facteur de transcription ZAT10, Hevein-like protein,...). L'identification d'un aussi grand nombre de cibles de thiorédoxine impliquées dans les mécanismes de défense en réponse aux stress biotiques est inhabituelle puisque, jusqu'à maintenant, seule la myrosinase a été identifiée comme cible de la TRX h3 chez *Arabidopsis* par approche protéomique, à partir d'extrait foliaire (Marchand et al., 2004). Des endochitinases ont par ailleurs été identifiées comme cibles putatives des TRX h1 et h2 dans les graines d'orge (Maeda et al., 2004). Ceci suggère une implication spécifique de la TRX z dans ces réponses par rapport aux autres thiorédoxines plastidiales. Ces cibles retiendront particulièrement notre attention à l'avenir et la régulation de certaines de ces cibles par la TRX z sera étudiée.

L'implication des thiorédoxines cytosoliques dans ces voies de signalisation a déjà été démontrée. En effet, les modifications redox qui surviennent lors des attaques pathogènes déterminent l'activité de NPR1, un régulateur central de l'expression des gènes de défense sous le contrôle de l'acide salicylique (Mou et al., 2003) et un régulateur de la croissance cellulaire (Vanacker et al., 2001). En réponse à une attaque pathogène, NPR1 est activé par réduction et induit l'expression d'un ensemble de gène PR (« Pathogenesis-related ») et de

gènes codant les facteurs de transcription WRKY, responsables des réponses de défense locale (« Hypersensitive Response », HR) et distale (« Systemic Acquired Resistance », SAR) (Loake and Grant, 2007). Des travaux menés chez *Arabidopsis* montrent que la réduction de NPR1 est catalysée par la TRX cytosolique h5, impliquant directement les thiorédoxines dans la réponse des plantes aux attaques pathogènes (Tada et al., 2008). De plus, il a été montré que la TRX h5 est surexprimée chez *Arabidopsis* durant les interactions incompatibles avec la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*, par un mécanisme impliquant probablement les facteurs de transcription WRKY (Laloi et al., 2004). Concernant les thiorédoxines plastidiales, seul l'orthologue de la TRX z de la tomate, la CITRX, a été impliquée dans la réponse de défense aux attaques pathogènes. En effet, des analyses menées *in vivo* sur des plantes qui sous-expriment la CITRX valident sa fonction de régulateur négatif de la mort cellulaire induite (HR) lors d'une interaction plante–pathogène incompatible (Rivas et al., 2004).

De plus, une recherche de substrats des MAP kinases 3 et 6, dont le rôle central dans le déclenchement des cascades de réponses de défense après une attaque pathogène est clairement établi, a identifié la TRX z comme substrat potentiel de ces kinases (Feilner et al., 2005). La disponibilité au laboratoire d'un mutant d'insertion d'ADN-T de *trx z* homozygote viable (« knock down ») a permis d'étudier le rôle de la TRX z dans la réponse immune innée (résistance basale, appelée « PAMP-Triggered Immunity », PTI) en réponse à la flagelline 22 (flg 22), un peptide commercial qui mime l'attaque bactérienne. L'étude de l'activation des MAP kinases 3 et 6 en réponse à la flg 22 révèle qu'en l'absence de TRX z, ces MAP kinases ne sont pas phosphorylées et donc pas activées. De plus, l'expression de gènes marqueurs de la voie PTI, *FRK1* et *At2g17740*, est considérablement réprimée chez le mutant *trxz*. Cela suggère que la TRX z joue un rôle au cours de la mise en place des réponses de défense dans la plante après attaque pathogène (Figure 65).

La TRX z semble intervenir à un niveau post-traductionnel lors de l'activation par phosphorylation des MAP kinases 3 et 6. La TRX z pourrait intervenir directement au niveau de ces MAP kinases ou, plus probablement, pourrait jouer un rôle en amont des MAP kinases, soit en régulant l'activité d'une kinase amont, soit en régulant directement le déclenchement de la voie PTI. Cela a été observé chez la tomate, où la CITRX, l'orthologue de la TRX z, régule la mise en place des réponses de défense du fait de son rôle d'adaptateur entre le récepteur transmembranaire de la protéine de résistance Cf-9 et la kinase ACIK1. La

CITRX permet le recrutement de la kinase ACIK1, permettant ainsi, après attaque pathogène, le déclenchement des réponses de défense de la plante menant à la réponse hypersensible (HR), et ce indépendamment du redox (Rivas et al., 2004; Nekrasov et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, en absence de TRX z, il est fort probable que la voie de réponses de défense ne se mette pas en place, ce qui explique que l'activation par phosphorylation des MAP kinases 3 et 6 ne se fasse pas. La TRX z étant un substrat potentiel de ces MAP kinases, il est possible que la TRX z régule la voie de la PTI en amont des MAP kinases et, lorsque ces dernières sont activées, elles pourraient phosphoryler la TRX z et modifier son activité. Cela suggère que la TRX z pourrait être l'élément clé d'un rétrocontrôle, *via* les MAP kinases, de la voie de la réponse immune innée chez les plantes.

Par ailleurs, le défaut d'expression des gènes marqueurs de la voie de la PTI (*FRK1* et *At2g17740*) chez le mutant *trxz* suggère que la TRX z régule, directement ou indirectement, l'expression de ces gènes. La TRX z pourrait réguler, par modification post-traductionnelle, l'activité d'un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression des gènes *FRK1* et *At2g17740*, comme cela a été observé pour le facteur de transcription ZAT 10. Ce dernier a été identifié, comme la TRX z, comme substrat des MAP kinases 3 et 6. De plus, il a récemment été montré que l'activité du facteur ZAT 10 est régulée par phosphorylation directe par ces MAP kinases, ce qui entraîne un changement de conformation et/ou induit une meilleure stabilité de ZAT 10 (Nguyen et al., 2012). La phosphorylation de ZAT 10 induit une modification de son activité transcriptionnelle, ce qui a pour conséquence de modifier l'expression de ses gènes cibles.

L'identification du facteur de transcription ZAT 10 comme cible potentielle de la TRX z renforce l'idée que la TRX z pourrait être un régulateur post-traductionnel de l'expression de gènes *via* un facteur de transcription (Figure 65). Il semble tout à fait intéressant, à la vue de nos résultats, d'étudier l'éventuelle phosphorylation de la TRX z ainsi que la potentielle régulation redox des MAP kinases 3 et 6 par la TRX z. De plus, l'interaction entre la TRX z et ZAT 10 doit être confirmée en système levure. Si tel est le cas, il serait alors intéressant d'étudier l'effet de la mutation sur un ou plusieurs résidus cystéine des deux partenaires, afin de déterminer si l'interaction entre ces deux protéines implique ou non une régulation redox. A plus long terme, la validation de l'interaction entre la TRX z et ZAT 10 *in planta*, par des expériences de Bimolecular fluorescence complementation (BiFC), permettrait de

déterminer dans quel compartiment subcellulaire ces deux protéines se rencontrent dans la cellule.

Il est important de souligner que la majorité des cibles de la TRX z, protéine chloroplastique, sont localisées dans d'autres compartiments subcellulaires, *i.e.* le cytosol, la vacuole, la membrane plasmique et/ou la paroi cellulaire, les mitochondries et le noyau. Cela soulève donc la question de savoir si la TRX z joue son rôle uniquement dans les plastes ou si cette thiorédoxine a la capacité de réguler des cibles dans un autre compartiment subcellulaire. Parmi les cibles identifiées, on retrouve la farnésyltransférase A, enzyme impliquée dans la relocalisation de ses protéines cibles. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que la localisation subcellulaire de la protéine AtIPT3 (Adenosine phosphate-isopentenyl-transferase) est dépendante de sa farnésylation. En effet, la protéine AtIPT3 est adressée aux chloroplastes lorsqu'elle n'est pas farnésylée mais lorsqu'elle l'est, celle-ci se trouve localisée dans le noyau et/ou le cytosol (Galichet et al., 2008). Par ailleurs, la CITRX a été initialement supposée cytosolique, du fait de la localisation de sa cible, Cf-9 (récepteur de la membrane plasmique). Cela suggère que la TRX z aurait la capacité, soit de changer de compartiment, *via* une modification post-traductionnelle ou un transport couplé à une autre protéine par exemple (Figure 65), soit d'être séquestrée dans le cytosol, tout comme cela a récemment été montré pour la TRX m2 (Meyer et al., 2011), potentiellement par une modification post-traductionnelle au niveau de son peptide d'adressage qui empêcherait l'adressage de la TRX z au chloroplaste, ce qui suggère une synthèse *de novo* de la TRX z lorsque le contexte le requiert.

Tout ceci indique que la TRX z semble jouer un rôle dans la mise en place de la réponse immune innée et qu'elle pourrait réguler des cibles cytosoliques, nucléaires voire transmembranaires, impliquées dans ces voies de signalisation. Il paraît de ce fait fondamental d'étudier la localisation subcellulaire de la TRX z après attaque pathogène. Les lignées GFP générées au cours de ma thèse seront un outil précieux dans l'étude de la localisation et la potentielle relocalisation de la TRX z dans ces conditions.

Bien que la TRX z soit la dixième thiorédoxine plastidiale, il apparaît clairement que cette thiorédoxine présente des caractéristiques qui lui sont propres et qui la distinguent des autres thiorédoxines plastidiales, la rendant unique. Ses propriétés physico-chimiques

(formation de complexes protéiques de masse moléculaire élevée se liant potentiellement aux acides nucléiques) et son système de réduction en font une thiorédoxine plastidiale très atypique ; les données connues concernant son rôle dans le complexe de l'ARN polymérase plastidiale et l'identification de nombreuses cibles impliquées dans la liaison aux acides nucléiques et/ou la régulation de l'expression des gènes suggèrent un rôle de régulateur fondamental dans le chloroplaste ; enfin, l'identification de nombreuses cibles impliquées dans les réponses aux stress biotiques suggère que la TRX z, à la différence des autres thiorédoxines plastidiales, est un acteur important dans la régulation des voies de défense mises en place par la plante. Cependant, pour l'ensemble de ces processus, il reste à savoir si la TRX z se comporte comme une oxydoréductase de ponts disulfure classique ou si, du fait de ses particularités physico-chimiques, la TRX z va réguler l'activité de protéines en modifiant leur conformation, indépendamment ou non du redox, pour potentiellement jouer le rôle d'une protéine senseur de l'état d'oxydoréduction de la cellule.

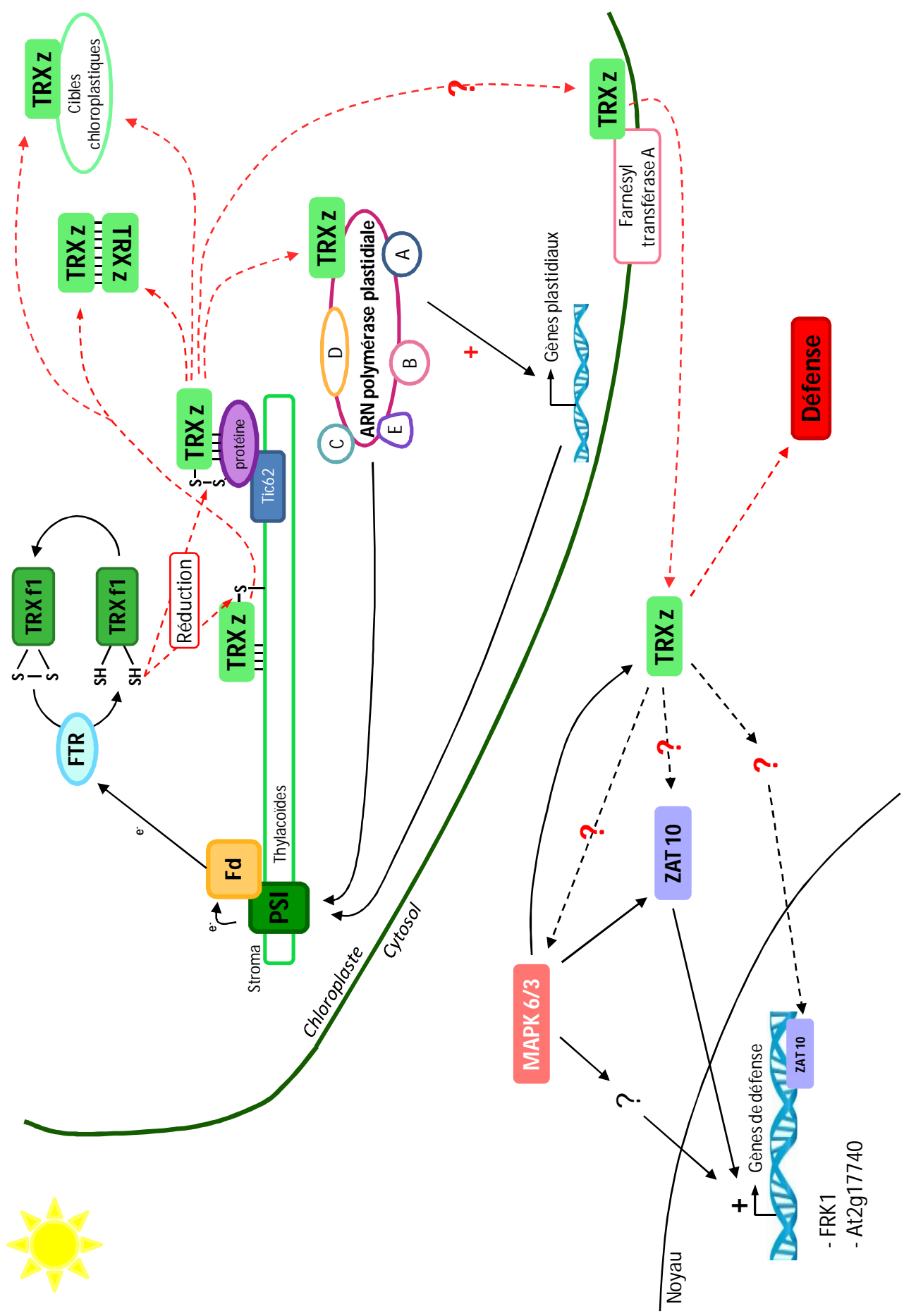


Figure 65 : Modèle du rôle de la TRX z dans la cellule.

A l'obscurité, la TRX z pourrait être directement liée aux membranes des thylacoïdes ou indirectement via son interaction avec une autre protéine (Tic62 ou autre).

A la lumière, le système FTR réduit la TRX f1, qui peut à son tour réduire la TRX z. La TRX z est ainsi solubilisée dans le stroma où elle peut soit interagir avec elle-même (dimérisation) soit interagir avec ses cibles chloroplastiques. La TRX z peut également jouer son rôle de sous-unité dans le complexe de l'ARN polymérase plastidiale, permettant ainsi la régulation de l'expression des gènes plastidiaux.

Au niveau de la membrane du chloroplaste, la TRX z pourrait interagir avec la Farnésyltransférase A et subir une modification post-traductionnelle permettant sa relocalisation subcellulaire du chloroplaste vers le cytosol.

Dans le cytosol, la TRX z pourrait alors réguler ses cibles cytosoliques tel que le facteur de transcription ZAT 10 qui est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes nucléaires. La TRX z joue un rôle dans la voie PTI, en régulant, directement ou indirectement, l'activation des MAP kinases 3 & 6 et l'expression des gènes marqueurs de la voie PTI (FRK1 et At2g17740), ce qui pourrait moduler les réponses de défense.

Bibliographie

A

Albrecht C, Boutrot F, Segonzac C, Schwessinger B, Gimenez-Ibanez S, Chinchilla D, Rathjen JP, De Vries SC, Zipfel C (2012) Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 303-8

Alte F, Stengel A, Benz JP, Petersen E, Soll J, Groll M, Bölter B (2010) Ferredoxin: NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19260-19265

Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustün S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Börnke F (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant cell* **22**: 1498-515

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977-83

B

Baier M, Dietz KJ (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology* **119**: 1407-14

Balmer Y, Koller A, Val G Del, Schürmann P, Buchanan BB (2004) Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynthesis research* **79**: 275-80

Barajas-López JDD, Serrato AJ, Cazalis R, Meyer Y, Chueca A, Reichheld JP, Sahrawy M (2011) Circadian regulation of chloroplastic f and m thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. *Journal of experimental botany* **62**: 2039-51

Bartsch S, Monnet J, Selbach K, Quigley F, Gray J, Von Wettstein D, Reinbothe S, Reinbothe C (2008) Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 4933-8

Benitez-Alfonso Y, Cilia M, San Roman A, Thomas C, Maule A, Hearn S, Jackson D (2009) Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3615-20

- Benz JP, Lintala M, Soll J, Mulo P, Bölter B** (2010) A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in plant science* **15**: 608-13
- Benz JP, Stengel A, Lintala M, Lee Y-H, Weber A, Philippar K, Gügel IL, Kaieda S, Ikegami T, Mulo P, et al** (2009) Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *The Plant Cell* **21**: 3965-83
- Bertini L, Proietti S, Aleandri MP, Mondello F, Sandini S, Caporale C** (2012) Modular structure of HEL protein from Arabidopsis reveals new potential functions for PR-4 proteins. *Biological Chemistry* **0**: 1-14
- Bohrer A-S, Massot V, Innocenti G, Reichheld J-P, Issakidis-Bourguet E, Vanacker H** (2012) New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin z from Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/ers283
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB** (2009) The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in Arabidopsis. *Plant molecular biology* **69**: 541-52
- Broin M, Cuiné S, Eymery F, Rey P** (2002) The Plastidic 2-Cysteine Peroxiredoxin Is a Target for a Thioredoxin Involved in the Protection of the Photosynthetic Apparatus against Oxidative Damage. *The Plant Cell* **14**: 1417-1432
- Broin M, Cuiné S, Peltier G, Rey P** (2000) Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS letters* **467**: 245-8
- Broin M, Rey P** (2003) Potato Plants Lacking the CDSP32 Plastidic Thioredoxin Exhibit Overoxidation of the BAS1 2-Cysteine Peroxiredoxin and Increased Lipid Peroxidation in Thylakoids under Photooxidative Stress. *Plant Physiology* **132**: 1335-1343
- Buchanan B, Wolosiuk R** (1976) Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. *Nature* **264**: 666-670
- Buchanan BB, Balmer Y** (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annual review of plant biology* **56**: 187-220
- Buchanan BB, Kalberer PP, Arnon DI** (1967) Ferredoxin-activated Fructose Diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochemical and biophysical research communications* **29**: 74-79
- Buchanan BB, Schürmann P, Kalberer PP** (1971) Ferredoxin-activated Fructose Diphosphatase of Spinach Chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *The Journal of biological chemistry* **246**: 5952-5959
- Buchanan BB, Wolosiuk RA, Crawford NA, Yee BC** (1978) Evidence for three thioredoxins in leaves. *Plant physiology* **61**: 38

Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR, Browning KS (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. The Journal of biological chemistry **276**: 2122-31

Burow M, Zhang Z-Y, Ober J a, Lambrix VM, Wittstock U, Gershenzon J, Kliebenstein DJ (2008) ESP and ESM1 mediate indol-3-acetonitrile production from indol-3-ylmethyl glucosinolate in Arabidopsis. Phytochemistry **69**: 663-71

C

Chibani K, Tarrago L, Schürmann P, Jacquot J-P, Rouhier N (2011) Biochemical properties of poplar thioredoxin z. FEBS letters **585**: 1077-81

Chow LP, Iwadate H, Yano K, Kamo M, Tsugita a, Gardet-Salvi L, Stritt-Etter a L, Schürmann P (1995) Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase catalytic subunit and identification of thiol groups constituting a redox-active disulfide and a [4Fe-4S] cluster. European journal of biochemistry / FEBS **231**: 149-56

Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin J-M, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. The Journal of biological chemistry **278**: 23747-52

Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz K-J, Issakidis-Bourguet E (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. Plant physiology **136**: 4088-4095

Crawford N, Yee B, Hutcheson S, Wolosiuk R, Buchanan B (1986) Enzyme regulation in C4 photosynthesis. 6. Purification, properties and activities of thioredoxins from C4 and C3 plants. Archives of Biochemistry and Biophysics **244**: 1-15

D

Dai S, Johansson K, Miginiac-Maslow M, Schürmann P, Eklund H (2004) Structural Basis of Redox Signaling in Photosynthesis: Structure and Function of Ferredoxin:thioredoxin Reductase and Target Enzymes. Photosynthesis research **79**: 233-48

Dietz K-J, Pfannschmidt T (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. Plant physiology **155**: 1477-85

Droux M, Jacquot J, Miginiac-Maslow M, Gadal P, Huet J, Crawford N, Yee B, Buchanan B (1987a) Ferredoxin-Thioredoxin reductase, an iron sulfure enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C3, C4 and cyanobacterial species. Archives of Biochemistry and Biophysics **252**: 426-439

Droux M, Miginiac-Maslow M, Jacquot J, Gadal P, Crawford N, Kosower N, Buchanan B (1987b) Ferredoxin-Thioredoxin reductase, a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**: 372-380

E

Ehn M, Nilsson P, Uhlén M, Hober S (2001) Overexpression, rapid isolation, and biochemical characterization of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein. *Protein expression and purification* **22**: 120-7

Ehsan H, Ray WK, Phinney B, Wang X, Huber SC, Clouse SD (2005) Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **43**: 251-61

Ejiri S, Weissbach H, Brot N (1979) Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **139**: 161-164

Engström N-E, Holmgren A, Larsson A, Söderhäll S (1974) Isolation and Characterization of Calf Liver Thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry* **249**: 205-210

F

Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RGH, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, et al (2005) High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **4**: 1558-68

Fernandes AP, Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* **6**: 63-74

G

Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant physiology* **146**: 1155-64

Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J-P (2003) Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters* **555**: 443-448

Giacomelli L, Rudella A, Wijk KJ Van (2006) High Light Response of the Thylakoid Proteome in Arabidopsis Wild Type and the Ascorbate-Deficient Mutant *vtc2-2*. A Comparative Proteomics Study 1 [W]. *Society* **141**: 685-701

Goyer A, Haslekås C, Miginiac-Maslow M, Klein U, Le Marechal P, Jacquot J-P, Decottignies P (2002) Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**: 272-82

Grzyb J, Gagoś M, Gruszecki W, Bojko M, Strzałka K (2008) Interaction of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase with model membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1778**: 133-42

H

Hanke GT, Kimata-ariga Y, Taniguchi I, Hase T (2004) A Post Genomic Characterization of Arabidopsis Ferredoxins 1. **134**: 255-264

Hastings MH, Maywood ES, O'Neill JS (2008) Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Current biology: CB* **18**: R805-R815

He P, Shan L, Lin N-C, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T, Sheen J (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* **125**: 563-75

Hodges M, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Jacquot J-P, Stein M, Lepiniec L, Crétin C, Gadal P (1994) Purification and characterization of pea thioredoxin f expressed in *Escherichia coli*. *Plant molecular biology* **26**: 225-234

Holmgren A (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure (London, England: 1993)* **3**: 239-43

Holmgren A (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *The Journal of biological chemistry* **254**: 9627-9632

Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside- diphosphate reductase dependent upon glutathione. **73**: 2275-2279

Holmgren A (1968) Thioredoxin 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *European Journal of Biochemistry* **6**: 475-484

Holmgren A, Söderberg BO, Eklund H, Brändén CI (1975) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 2305-9

Häggglund P, Bunkenborg J, Maeda K, Svensson B (2008) Identification of Thioredoxin Disulfide Targets Using a Quantitative Proteomics Approach Based on Isotope-Coded Affinity Tags. *Journal of proteome research* **5270-5276**

I

Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**: 456-63

Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **25**: 127-35

J

Jacquot J, Vidal J, Gadal P, Schürmann P (1978) Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS Lett* **243-246**

Jacquot J-P, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Maréchal P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y (1994) Arabidopsis thaliana NADPH Thioredoxin Reductase: cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli. *Journal of molecular biology* **235**: 1357-1363

Jiang J, Clouse SD (2001) Expression of a plant gene with sequence similarity to animal TGF-beta receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **26**: 35-45

Johansson K, Ramaswamy S, Saarinen M, Lemaire-Chamley M, Issakidis-Bourguet E, Miginiac-Maslow M, Eklund H (1999) Structural basis for light activation of a chloroplast enzyme: the structure of sorghum NADP-malate dehydrogenase in its oxidized form. *Biochemistry* **38**: 4319-26

Johnson T, Cao R, Kung J, Buchanan B (1987) Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta* **171**: 321-331

Jurić S, Hazler-Pilepić K, Tomasić A, Lepedus H, Jelčić B, Puthiyaveetil S, Bionda T, Vojta L, Allen JF, Schleiff E, et al (2009) Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *The Plant Journal* **60**: 783-794

K

Kleffmann T, Russenberger D, Von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruissem W, Baginsky S (2004) The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current biology: CB* **14**: 354-62

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705

König J, Muthuramalingam M, Dietz K-J (2012) Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current opinion in plant biology* **15**: 261-8

L

Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage-T4. *Nature* **227**:

Laloi C, Mestres-ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld J (2004) The Arabidopsis Cytosolic Thioredoxin h5 Gene Induction by Oxidative Stress and Its W-Box-Mediated Response to Pathogen Elicitor 1. *Plant Physiology* **134**: 1006-1016

Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienemberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14144-9

Laugier E, Tarrago L, Courteille A, Innocenti G, Eymery F, Rumeau D, Issakidis-Bourguet E, Rey P (2012) Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light. *Plant, cell & environment*. doi: 10.1111/pce.12005

Laurent T., Moore E., Reichard P (1964) Synthesis of Deoxyribonucleotides IV. Isolation and Characterization of Thioredoxin Hydrogen Donor from Escherichia Coli B. *The Journal of biological chemistry* **239**: 3436-3444

Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada a., Miginiac-Maslow M (2003) Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii. *FEBS Letters* **543**: 87-92

Lennartz K, Plücken H, Seidler A, Westhoff P, Bechtold N, Meierhoff K (2001) HCF164 Encodes a Thioredoxin-Like Protein Involved in the Biogenesis of the Cytochrome b 6 f Complex in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**: 2539-2551

Lennon BW (2000) Twists in Catalysis: Alternating Conformations of Escherichia coli Thioredoxin Reductase. *Science* **289**: 1190-1194

Lingard MJ, Trelease RN (2006) Five Arabidopsis peroxin 11 homologs individually promote peroxisome elongation, duplication or aggregation. *Journal of cell science* **119**: 1961-72

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* **25**: 402-8

Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Current opinion in plant biology* **10**: 466-72

Lorang J, Kidarsa T, Bradford CS, Gilbert B, Curtis M, Tzeng S-C, Maier CS, Wolpert TJ (2012) Tricking the guard: exploiting plant defense for disease susceptibility. *Science* (New York, NY) **338**: 659-62

M

Maeda K, Finnie C, Svensson B (2004) Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *The Biochemical journal* **378**: 497-507

Marchand C, Le Marechal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P (2004) New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**: 2696-2706

Marchand CH, Vanacker H, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Maréchal P Le, Decottignies P (2010) Thioredoxin targets in Arabidopsis roots. *Proteomics* **10**: 2418-28

Mark DF, Richardson CC (1976) Escherichia coli thioredoxin: A subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 780-784

Marri L, Zaffagnini M, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD, Pupillo P, Sparla F, Miginiac-Maslow M, Trost P (2009) Prompt and easy activation by specific thioredoxins of calvin cycle enzymes of Arabidopsis thaliana associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Molecular plant* **2**: 259-69

Marx C, Wong JH, Buchanan BB (2003) Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* **216**: 454-60

Meindl T, Boller T, Felix G (2000) The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept. *The Plant cell* **12**: 1783-94

Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 3900-5

Mestres-Ortega D, Meyer Y (1999) The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**: 307-16

Meyer T, Hölscher C, Schwöppe C, Von Schaewen A (2011) Alternative targeting of Arabidopsis plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD1 involves cysteine-dependent interaction with G6PD4 in the cytosol. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **66**: 745-58

- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld J-P, Riondet C** (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **17**: 1124-60
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP** (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in enzymology* **347**: 394-402
- Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin J-M, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, et al** (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16478-83
- Mira H, Martínez N, Peñarrubia L** (2002) Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta* **214**: 939-46
- Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Gustafsson J, Spyrou G** (1997) Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *The Journal of biological chemistry* **272**: 30841-30847
- Montrichard F, Alkhalifioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of proteomics* **72**: 452-74
- Moore E., Laurent T., Thelander L** (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *The Journal of biological chemistry* **239**: 3445-3452
- Motohashi K, Kondoh a, Stumpp MT, Hisabori T** (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11224-9
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-44

N

- Nekrasov V, Ludwig A a, Jones JDG** (2006) CITRX thioredoxin is a putative adaptor protein connecting Cf-9 and the ACIK1 protein kinase during the Cf-9/Avr9- induced defence response. *FEBS letters* **580**: 4236-41
- Nguyen XC, Kim SH, Lee K, Kim KE, Liu X-M, Han HJ, Hoang MHT, Lee S-W, Hong JC, Moon Y-H, et al** (2012) Identification of a C2H2-type zinc finger transcription factor (ZAT10) from *Arabidopsis* as a substrate of MAP kinase. *Plant cell reports* **31**: 737-45
- Novelli G, D'Apice MR** (2012) Protein farnesylation and disease. *Journal of inherited metabolic disease* **35**: 917-26

Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS letters* **583**: 2827-32

O

Orth T, Reumann S, Zhang X, Fan J, Wenzel D, Quan S, Hu J (2007) The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in Arabidopsis. *The Plant cell* **19**: 333-50

O'Neill JS, Van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget F-Y, Reddy AB, Millar AJ (2011) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* **469**: 554-8

P

Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz K, Oelmu R (2006) pTAC2 , -6 , and -12 Are Components of the Transcriptionally Active Plastid Chromosome That Are Required for Plastid Gene Expression. *Components* **18**: 176-197

Potter S, Uknes S, Lawton K, Winter A, Chandler D, DiMaio J, Novitzky R, Ward E, Ryals J (1993) Regulation of a hevein-like gene in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **6**: 680-685

Pulido P, Spínola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz K-J, González M, Cejudo FJ (2010) Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in Arabidopsis thaliana chloroplasts. *Journal of experimental botany* **61**: 4043-54

Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant cell* **18**: 2356-68

R

Ramage P, Hemmig R, Mathis B, Cowan-Jacob SW, Rondeau JM, Kallen J, Blommers MJJ, Zurini M, Rüdiger S (2002) Snags with tags: Some observations made with (His) 6 - tagged proteins. *Life Science News* 1-4

Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology* **12**: 509-17

Reichheld J-P, Mestres-Ortega D, Laloi C, Meyer Y (2002) The multigenic family of thioredoxin h in Arabidopsis thaliana: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 685-690

- Reichheld J-P, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y** (2005) AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **579**: 337-42
- Rey P, Cuiné S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot J-P, Rouhier N, Broin M** (2005) Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **41**: 31-42
- Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier G** (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **13**: 97-107
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schausser L, Yoshioka H, Jones JDG** (2004) CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO journal* **23**: 2156-65
- Rowland O, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieul F, Tracy FE, Yoshioka H, Durrant WE, Fritz-laylin L, Nekrasov V, Sjo K, et al** (2005) Functional Analysis of Avr9 / Cf-9 Rapidly Elicited Genes Identifies a Protein Kinase , ACIK1 , That Is Essential for Full Cf-9–Dependent Disease Resistance in Tomato. *Analysis* **17**: 295-310
- Ruelland E, Lemaire-Chamley M, Le Maréchal P, Issakidis-Bourguet E, Djukic N, Miginiac-Maslow M** (1997) An internal cysteine is involved in the thioredoxin-dependent activation of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* **272**: 19851-7
- Russel M, Model P** (1988) Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *The Journal of biological chemistry* **263**: 9015-9019

S

- Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T** (1998) Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant & cell physiology* **39**: 895-7
- Scheibe R, Anderson L** (1981) Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochemica and Biophysica Acta - Bioenergetics* **636**: 58-64
- Schmidt TGM, Skerra A** (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**: 1528-35
- Schröter Y, Steiner S, Matthäi K, Pfannschmidt T** (2010) Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics* **10**: 2191-204

- Schägger H, Von Jagow G** (1987) Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**: 368-379
- Schürmann P, Buchanan BB** (1975) Role of ferredoxin in the activation of sedoheptulose diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochemica and Biophysica Acta - Bioenergetics* **376**: 189-192
- Schürmann P, Wolosiuk R, Breazeale V, Buchanan B** (1976) Two proteins function in regulation of photosynthetic CO₂ assimilation in chloroplasts. *Nature* **263**: 257-258
- Serrato AJ, Cejudo FJ** (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**: 392-9
- Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Cejudo FJ** (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 43821-7
- Shahpiri A, Svensson B, Finnie C** (2008) The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase. *Plant physiology* **146**: 789-99
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell host & microbe* **4**: 17-27
- Shimizu M, Kato H, Ogawa T, Kurachi A, Nakagawa Y, Kobayashi H** (2010) Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 10760-10764
- Stein M, Jacquot J, Jeanette E, Decottignies P, Hodges M, Lancelin J, Mittard V, Schmitter J, Migonias-Maslow M** (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxins: structure of the genes coding for the chloroplastic m and cytosolic h isoforms, expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant molecular biology* **28**: 487-503
- Steiner S, Dietzel L, Schröter Y, Fey V, Wagner R, Pfannschmidt T** (2009) The role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard. *Molecular Plant* **2**: 416-429
- Steiner S, Schröter Y, Pfalz J, Pfannschmidt T** (2011) Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant physiology* **157**: 1043-55

T

- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* (New York, NY) **321**: 952-6
- Thormählen I, Ruber J, Von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich S-M, Massot V, Hümmer C, Tezycka J, Issakidis-Bourguet E, Geigenberger P** (2012) Inactivation of thioredoxin f1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of Arabidopsis plants. *Plant, cell & environment*. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02549.x
- Tsang M** (1981) Assimilatory sulfate reduction in *Escherichia coli*: identification of the alternative cofactor for adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate reductase as glutaredoxin. *Journal of Bacteriology* **146**: 1059-1066
- Tsang M, Schiff J** (1976) Sulfate-reducing pathway in *Escherichia coli* involving bound intermediates. *Journal of Bacteriology* **125**: 923-933

U

- Utsugi S, Sakamoto W, Murata M, Motoyoshi F** (1998) Arabidopsis thaliana vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant molecular biology* **38**: 565-76

V

- Vanacker H, Lu H, Rate DN, Greenberg JT** (2001) A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in Arabidopsis. *The Plant Journal* **28**: 209-16
- Verdoucq L, Vignols F, Jacquot JP, Chartier Y, Meyer Y** (1999) In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *The Journal of biological chemistry* **274**: 19714-22
- Vignols F, Bréhélin C, Surdin-Kerjan Y, Thomas D, Meyer Y** (2005) A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16729-34

W

- Waksman G, Krishna SRT, Williams CH, Kuriyan J** (1994) Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution: implication for a large conformational change during catalysis. *Journal of Molecular Biology* **236**: 800-816

Wolosiuk A, Crawford A, Yee C, Buchanan B (1979) Isolation of Three Thioredoxins from Spinach Leaves *. The Journal of biological chemistry **254**: 1627-1632

Wolosiuk R a, Buchanan BB (1978a) Activation of Chloroplast NADP-linked Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by the Ferredoxin/Thioredoxin System. Plant physiology **61**: 669-71

Wolosiuk R, Buchanan B (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. Nature **266**: 565-567

Wolosiuk RA, Buchanan BB (1978b) Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. Archives of Biochemistry and Biophysics **189**: 97-101

Wolosiuk RA, Buchanan BB, Crawford NA (1977) Regulation of NADP-Malate Dehydrogenase by light-actuated ferredoxin-thioredoxin system of chloroplasts. FEBS letters **81**: 253-258

Wong JH, Balmer Y, Cai N, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2003) Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics. FEBS Letters **547**: 151-156

Wu J, Filutowicz M (1999) Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: A cautionary tale. Acta Biochimica Polonica **46**: 591-599

Y

Yano H, Wong JH, Lee YM, Cho MJ, Buchanan BB (2001) A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 4794-9

Z

Zhang N, Portis AR (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 9438-43

Zhang Z, Ober JA, Kliebenstein DJ (2006) The Gene Controlling the Quantitative Trait Locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 Alters Glucosinolate Hydrolysis and Insect Resistance in Arabidopsis. **18**: 1524-1536

Zhou A (1997) Improved alkaline lysis method for rapid isolation of plasmid DNA. Biotechniques **23**: 994-994

Annexes

Fiches techniques

1 – Milieux de culture

Milieux de culture des bactéries

Milieu LB

Bactotryptone 10 g/L

Bacto yeast extract 5 g/L

NaCl 10 g/L

Milieux solides : Agar 18 g/L en supplément

Milieux de culture des levures

Milieu YNB

Yeast Extract Nitrogen Base without added amino acid and with ammonium sulfate (Conda) 7 g/L

Glucose 20 g/L

Milieux solides : Agar 20 g/L en supplément

Acides aminés et bases (Sigma)

L-Histidine 20 g/L dans H₂O

Uracile 2 g/L dans NaH CO₃ 0,5%

L-Lysine 15 g/L dans H₂O

Adénine 4 g/L dans H₂O + 12,5 mL HCl 4N/L

L-Méthionine 15 g/L dans H₂O

L-Leucine 10 g/L dans H₂O

L-Tryptophane 2 g/L dans NaH CO₃ 0,5%

Pour 100 mL de milieu YNB (liquide et solide), ajouter 1 mL de chaque acide aminé et base (dilution 100X).

Milieux de culture de plantes *in vitro*

Milieu MS (pH 7,5)

NH_4NO_3 : 1,65 g/L

KNO_3 : 1,9 g/L

$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,44 g/L

$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,37 g/L

KH_2PO_4 : 0,37 g/L

2 – Tampons et solutions utilisées pour l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

(Méthode de Schägger et von Jagow, 1987)

Tampons de migration

Anode

Tris-HCl pH 8,9 100 mM

Cathode

Tris-HCl pH 8,25 100 mM

Tricine 100 mM

SDS 0,1%

Bleu dissociant 4X (Laemmli)

Tris-HCl pH 7,9 250 mM

SDS 10% (p/v)

Glycérol 40% (p/v)

Bleu de Bromophénol 0,1% (p/v)

Ne pas ajouter de β -Mercaptoéthanol

Composition des gels (espaceur de 1,5 mm)

	Gel de séparation 12%	Gel de focalisation 4,8%
Acryl/Bisacryl 30%	4 mL	800 μ L
Tris-HCl pH 8,45 2 M ; SDS 0,2%	5 mL	2,5 mL
Glycérol	1 mL	
APS 10%	50 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ L	5 μ L
H ₂ O		1,65 mL

Marqueur de masse moléculaire

Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (10 μ L) (Figure 66)

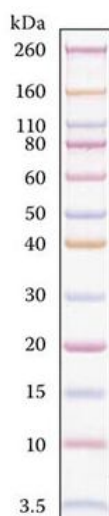


Figure 66 : Marqueur de masse moléculaire protéique Novex Sharp (Invitrogen).

Solutions de révélation des gels (coloration au bleu de Coomassie)

Solution de coloration

Acide acétique 10% (v/v)

Ethanol 50% (v/v)

Bleu de Coomassie R250 2 g/L

Solution de décoloration

Acide acétique 10% (v/v)

Ethanol 50% (v/v)

3 – Préparation d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline et précipitation au PEG

(Zhou *et al.*, 1997)

- 1- Faire cultiver *E. coli* transformée par le plasmide dans 5 mL de milieu LB additionné en ampicilline. Après une nuit de culture à 37°C, centrifuger les cellules bactériennes à vitesse maximale pendant 1 minute.
- 2- Remettre en suspension le culot bactérien dans 150 µL de GTE froid (Glucose 50 mM ; Tris-HCl 25 mM ; EDTA 10 mM, pH 8). Vortexer quelques secondes.
- 3- Ajouter 340 µL de tampon de lyse fraîchement préparé (NaOH 0,2 M ; SDS 1%). Mélanger rapidement le tube par retournements jusqu'à ce que le mélange devienne clair.
- 4- Faire précipiter les débris cellulaires et l'ADN chromosomique en ajoutant 460 µL d'acétate de potassium 4 M (préparé avec 80 mL d'acétate de potassium 5 M ; 11,5 mL d'acide acétique glacial et 8,5 mL d'eau). Mélanger le tube de suite par retournements.
- 5- Centrifuger à vitesse maximale à température ambiante pendant 3 minutes et transférer le surnageant dans un tube propre. Eviter de prélever le film flottant de matière dénaturée en submergeant la pointe de la pipette dans la solution avant prélèvement.
- 6- Ajouter ½ volume d'isopropanol et mélanger les tubes par retournements. Centrifuger à vitesse maximale pendant 3 minutes. Veiller à bien éliminer le surnageant en aspirant à la pipette et en centrifugeant à nouveau si nécessaire.
- 7- Remettre en suspension le culot dans 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM, pH 8) contenant 25 µg/mL de RNase, DNase-free. Incuber le tout à 37°C pendant 30 minutes.
- 8- Ajouter 100 µL de solution PEG 8000 à 40% (préparée dans du MgCl₂ 30 mM), bien homogénéiser et centrifuger à vitesse maximale pendant 10 minutes.
- 9- Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70% froid en le remettant en suspension et en centrifugeant 1 minute (répéter 3 fois).
- 10- Sécher les culots puis remettre en suspension l'ADN plasmidique dans 50 à 100 µL de TE.

4 – Solutions de transformations des levures

<u>Acétate de Lithium 10X</u>	Acétate de Lithium 1M (Sigma) Ajuster le pH à 7,5 avec de l'acide acétique. Stériliser par filtration (0,2 µm)
<u>TE 10X</u>	Tris-HCl pH 7,5 100 mM EDTA 1 mM Stériliser par filtration (0,2 µm)
<u>PEG 50%</u>	5 g de PEG 4000 (Sigma) dans 5,8 mL d'H ₂ O Stériliser par filtration (0,45 µm)
<u>ADN Carrier</u>	Solution à 10 mg/mL (Yeastmaker™ Carrier DNA, Clontech) Dénaturer 10 minutes à 100°C
<u>Solution A</u>	Acétate de Lithium 1X
<u>Solution B</u>	Acétate de Lithium 1X PEG 40% TE 1X

5 – Transformation des levures

Les premières étapes de transformation des levures pour réaliser un test d'interaction binaire ou un crible de banque d'ADNc sont identiques et détaillées ci-dessous.

- 1- Cultiver la souche de levure (CY306 ou YRG2) à 30°C sur la nuit en milieu YNB contenant les acides aminés nécessaires à la croissance des levures (HUKAMLW). Il est à noter que 5 mL de culture sont nécessaires pour effectuer une transformation.
- 2- Centrifuger la culture de nuit à 2000 rpm pendant 5 minutes et reprendre le culot dans 20 mL d'eau stérile.
- 3- Centrifuger à 2000 rpm pendant 5 minutes puis reprendre le culot dans 10 mL de solution A.
- 4- Centrifuger à 2000 rpm pendant 5 minutes et reprendre le culot final dans la solution A (1/100^{ème} du volume initial de culture).
- 5- Dans des tubes de 2 mL stériles, préparer le milieu de transformation :

<i>Criblage de banque d'ADNc</i>	<i>Tests d'interaction binaire</i>
50 µL de cellules	50 µL de cellules
0,5 à 1 µg d'ADN appât (pGBK :: TRX z)	0,5 à 1 µg de chaque ADN (pGAD/pGBK :: TRX z)
50 µg (5 µL) d'ADN carrier (chauffé à 100°C pendant 10 minutes)	50 µg (5 µL) d'ADN carrier (chauffé à 100°C pendant 10 minutes)
300 µL de solution B fraîchement préparée	300 µL de solution B fraîchement préparée

- 6- Mélanger par retournements et incubé à 28°C pendant 30 minutes.
- 7- Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 20° minutes.
- 8- Ajouter 1 mL de milieu YNB et mélanger doucement.
- 9- Centrifuger à 14000 rpm pendant 1 minute, éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot dans 150 µL de milieu YNB.
- 10- Etaler sur milieu YNB gélosé additionné en acides aminés nécessaires à la sélection et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours.

Dans le cas d'un criblage de banque d'ADNc, la transformation se poursuit comme indiqué ci-dessous.

- 1- Cultiver la souche de levure (CY306 ou YRG2) transformée par l'appât pGBK :: TRX z à 30°C sur la nuit en milieu YNB additionné en acides aminés (HUKAML) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 1.
- 2- Centrifuger la culture de nuit à 200 rpm pendant 5 minutes et reprendre le culot dans 20 mL d'eau stérile.

- 3- Centrifuger à 2000 rpm pendant 5 minutes puis reprendre le culot dans 20 mL de solution A.
- 4- Centrifuger à 2000 rpm pendant 5 minutes puis reprendre le culot dans 1 mL de solution A. Incuber à 28°C pendant 1 heure sous agitation douce.
- 5- Dans 5 tubes stériles de 2 mL, préparer le milieu de transformation :
 - 200 µL de cellules
 - 200 µg (20 µL) d'ADN carrier (chauffé à 100°C pendant 20 minutes)
 - 5 µg de banque d'ADNc
 - 1,2 mL de solution B fraîchement préparée
- 6- Mélanger par retournements et incuber à 28°C pendant 30 minutes sous agitation douce.
- 7- Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes.
- 8- Ajouter 700 µL de milieu YNB et mélanger doucement.
- 9- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 à 45 secondes, éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot dans 1 mL de milieu YPGA et incuber à 28°C pendant 1 heure sous agitation douce.
- 10- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 à 45 secondes, remettre en suspension chaque culot final dans 800 µL de milieu YNB et étaler sur milieu YNB gélosé sélectif (UKAM + 3-amino triazol (3-AT) 5 mM).
- 11- Incuber à 30°C et suivre la croissance des clones positifs (3 semaines ici).

6 – Extraction d'ADN de levure

- 1- Ensemencer 3 mL de milieu YNB additionné en acides aminés (UKAM) et incuber à 30°C sous agitation sur la nuit.
- 2- Centrifuger la culture à 8000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.
- 3- Remettre en suspension le culot dans 200 µL de solution I (Tris-HCl 50 mM ; EDTA 1 mM, pH 8 ; β -Mercaptoéthanol 1% (v/v)) et 6 µL de zymolase à 30 mg/mL (dans sucrose 10% (p/v) ; Lyticase from *Arthrobacter luteus*, Sigma). Ajouter 200 µL de billes (Glass Beads 425-600 µ, acid washed, Sigma).
- 4- Vortexer chaque tube 3 fois 30 secondes et placer dans la glace.
- 5- Incuber au bain marie à 37°C pendant 30 minutes.
- 6- Ajouter 200 µL de solution II (EDTA 80 mM pH 8 ; SDS 1% (v/v)) et mélanger par retournements.
- 7- Incuber au bain marie à 65°C pendant 30 minutes puis incuber sur glace.
- 8- Ajouter 100 µL de solution III froide (Acétate de Potassium 5 M) et mélanger par retournements.
- 9- Incuber sur glace pendant au moins 45 minutes.
- 10- Centrifuger à 14000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- 11- Ajouter 300 µL d'isopropanol et homogénéiser puis centrifuger à 14000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- 12- Rincer les culots avec 500 µL d'éthanol 70% froid et centrifuger à 14000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.
- 13- Sécher les culots et remettre en suspension dans 50 µL de TE 1X. Conserver à -20°C.

Annexes

Colloques & Congrès

- ◆ Retraite européenne des doctorants en Sciences du Végétal, « 2nd Joint Retreat of PhD Students in Plant Sciences »

Avril 2010, Cologne, Allemagne; sélection pour un poster

Biochemical study of a new thioredoxin from Arabidopsis thaliana; **Anne-Sophie BOHRER**, Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET and Hélène VANACKER

- ◆ Réunion annuelle du Groupement de Recherche « TRX et GRX »

Juillet 2011, Orsay, France ; présentation orale

An atypical reduction mechanism for the chloroplastic thioredoxin z in Arabidopsis thaliana; **Anne-Sophie BOHRER**, Gilles INNOCENTI, Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET and Hélène VANACKER

- ◆ « 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants »

Juillet 2011, Budapest, Hongrie; sélection pour une présentation orale

An atypical reduction mechanism for the chloroplastic thioredoxin z in Arabidopsis thaliana; **Anne-Sophie BOHRER**, Gilles INNOCENTI, Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET and Hélène VANACKER

- ◆ Colloque de la Société Française de Photosynthèse

Mai 2012, Paris, France; sélection pour une presentation orale

Study of thioredoxin z reveals NTRC as an alternative system for the reduction of thioredoxins in plastids; **Anne-Sophie BOHRER**, Gilles INNOCENTI, Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET and Hélène VANACKER

Présentation orale sélectionnée pour le prix du colloque de la Société Française de Photosynthèse 2012

- ◆ Congrès de la Société Française de Phytopathologie

Juin 2012, Paris, France ; sélection pour un poster

Rôle d'une nouvelle thiorédoxine plastidiale dans la réponse immune innée chez Arabidopsis thaliana ; **Anne-Sophie BOHRER**, Gilles INNOCENTI, Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET et Hélène VANACKER

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UNE NOUVELLE THIORÉDOXINE PLASTIDIALE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*, LA TRX z

Un des principaux acteurs impliqués dans la régulation du statut redox intracellulaire, permettant aux plantes de s'adapter aux contraintes environnementales, est une famille multigénique de petites (12-14 kDa) oxydoréductases ubiquistes appelées thiorédoxines (TRX). Le génome d'*Arabidopsis* code une vingtaine de TRX canoniques dont neuf sont plastidiales (TRX f, m, x et y). Très étudiées dans notre laboratoire par des approches biochimiques, les TRX de types f et m apparaissent réguler majoritairement l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme primaire tandis que les types x et y servent principalement de substrats réducteurs d'enzymes antioxydantes. Plus récemment, une dixième TRX, proposée plastidiale et nommée TRX z, a été identifiée. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé cette nouvelle TRX chloroplastique montrant des propriétés physico-chimiques inhabituelles, la rendant unique. En effet, la TRX z semble interagir, *via* des interactions électrostatiques, avec des protéines pour former des complexes de masses moléculaires élevées, potentiellement liés aux acides nucléiques. De plus, la TRX z, dont l'expression est induite à la lumière, principalement dans les tissus photosynthétiques, est la première TRX chloroplastique qui n'est pas réduite par le système FTR à la lumière mais qui peut être réduite par les autres TRX plastidiales, suggérant une interconnexion entre ces différentes TRX. D'autre part, une recherche exhaustive de cibles de la TRX z, par deux approches spécifiques et complémentaires (protéomique et double hybride), ont révélé 90 cibles putatives de la TRX z. La plupart de ces cibles, jamais identifiées comme cibles des TRX, sont impliquées dans la réponse de défense des plantes mise en place lors de stress biotiques. Ces résultats suggèrent que la TRX z pourrait être un élément clé dans la mise en place de ces réponses. L'analyse fonctionnelle préliminaire de la TRX z au cours de la réponse immune innée conforte cette hypothèse. L'ensemble de ces résultats indique que la TRX z pourrait jouer le rôle d'une protéine senseur de l'état d'oxydoréduction de la cellule.

Mots clés : Thiorédoxines plastidiales, signalisation redox, FTR, défense, stress biotique.

BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF A NEW PLASTIDIAL THIOREDOXIN IN *ARABIDOPSIS THALIANA*, TRX z

One of the main actors involved in regulation of the cellular redox state, which allow plant adaptation to stress environmental conditions, is a multigenic family of small (12-14 kDa) ubiquitous oxidoreductases named thioredoxins (TRX). *Arabidopsis* encodes around twenty canonical TRX, including nine plastidial isoforms (TRX f, m, x and y). Extensively studied in our laboratory by biochemical approaches, TRX f and m was found to mainly redox regulate the activity of enzymes involved in the primary metabolism whereas TRX x and y serve as reducing substrates for antioxidant enzymes. More recently, a tenth TRX, predicted plastidial and named TRX z, was identified. During my PhD, I have characterized this new plastidial TRX showing unusual physicochemical properties, making it unique. Indeed, TRX z seems to interact, *via* electrostatic bonds, with proteins to form high molecular weight complexes, potentially linked to nucleic acids. Moreover, TRX z, which is expressed in green tissues in the light, is the first plastidial TRX which is not reduced by the FTR system but which can be reduced by other plastidial TRX, suggesting an interconnection between these TRX. Furthermore, a large scale inventory of TRX z targets, by two specific and complementary approaches (proteomic and yeast two hybrid), revealed 90 putative TRX z targets. Most of these, which have never been identified as TRX targets before, are implicated in plant defense response to biotic stresses. These results suggest that TRX z might be a key player in these responses. Preliminary functional analysis of TRX z during immune innate response reinforces this hypothesis. Altogether, these results indicate that TRX z appears as an important sensor of the redox status of the cell.

Key words: Plastidial thioredoxins, redox signaling, FTR, plant defense response, biotic stress.